

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

Molekularbiologische Diskriminierung zwischen planktonischen,  
Biofilm- und „Viable but non-culturable“-Zellen

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Christoph Andreas Lehrich, geb. am 05.07.1990 in Speyer  
Rostock, 10.05.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell  
4.0 International Lizenz.

**Gutachter:**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Tiedge  
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Volkhard Kempf  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
Goethe-Universität Frankfurt

**Datum der Einreichung: 10.05.2019**

**Datum der Verteidigung: 13.05.2020**

# Danksagung

## **I. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit und die geduldige Korrektur und Anregungen danken.

Dr. Sylvio Redanz danke ich für die Betreuung, Einarbeitung und Fehlerkorrektur, die er mir, auch als er schon zu neuen Ufern auf anderen Kontinenten aufgebrochen war, noch zukommen ließ.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des IMIKRO, die in kleinen und großen Taten an der Durchführung der Versuchsaufbauten und Organisation im Labor beteiligt waren. Besonders seien hier Kathleen Arndt, Yvonne Humboldt und Jana Bull erwähnt, für die Unterstützung bei der Zelllyse, PCR-Protokollen und Photospektrometrie.

Außerdem danke ich Frau Dr. Anja Schaeper aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Rostock für die freundliche Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung eines Durchflusszytometers.

Herrn Prof. Dr. Holger Rohde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Beratung bezüglich geeigneter Bakterienstämme zur Untersuchung des VBNC-Zustandes und die Zusendung von Kulturen zur Verwendung in dieser Arbeit.

Meinen Freunden und Kollegen Dr. Carolin Klenk und Helen Lieb, die mit mir zusammen viele Tage und Nächte im Labor verbracht haben und die anstrengenden Zeiten zu wunderbaren Erinnerungen gemacht haben.

Meiner Lebensgefährtin Dr. Eva Gatzlik, die erst zum Ende der Erstellung dieser Arbeit in mein Leben getreten ist, gebührt ebenfalls Dank. Ohne ihre Aufmunterung, Wärme und Verständnis wäre dieser Abschluss nicht vorstellbar gewesen.

Meinen Eltern Andrea und Dr. Friedhelm Lehrich und meiner Schwester Johanna Lehrich danke ich von Herzen für fast drei Jahrzehnte bedingungsloser Unterstützung und Liebe. Diese Arbeit würde ohne euch nicht existieren.

## II. Inhaltsverzeichnis

I.	Danksagung .....	2
II.	Inhaltsverzeichnis .....	3
III.	Abbildungsverzeichnis .....	7
IV.	Tabellenverzeichnis .....	9
V.	Abkürzungsverzeichnis .....	11
1.	Einleitung .....	13
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	14
1.3	Biofilme .....	15
1.4	Implantat-assoziierte Infektionen .....	17
1.5	Der VBNC-Zustand .....	17
1.6	Quantifizierungsmethoden für lebende bakterielle Zellen .....	20
1.7	Das 16S-rRNA-Gen .....	23
1.8	Ziele dieser Arbeit .....	23
2	Material .....	26
2.1	Bakterienstämme .....	26
2.2	Oligonukleotide („Primer“) .....	26
2.3	Kulturmedien .....	27
2.3.1	BHI-Medium .....	27
2.3.2	BHI-Agar .....	27
2.3.3	Blutagarplatten .....	28
2.3.4	PBS-Medium .....	28
2.4	TAE Puffer .....	28
2.5	Enzyme und Testgebinde („Kits“) .....	29
2.6	Chemikalien .....	29
2.7	Software und „Online-Tools“ .....	30
		3

# Inhaltsverzeichnis

2.8	Größenstandards .....	31
2.9	Geräte und Hilfsmittel .....	32
3	Methodik .....	35
3.1	Stammhaltung .....	35
3.2	Bakterienkultivierung .....	35
3.2.1	Vorkulturen .....	35
3.2.2	Die Bestimmung der optischen Dichte.....	36
3.2.3	Wachstumsversuche .....	36
3.2.3.1	Induktion des VBNC-Zustandes.....	36
3.2.3.2	Konzentrierung von VBNC-Zellen.....	37
3.2.3.3	Kultivierung und Ernte von Biofilmzellen.....	37
3.2.3.4	Gewinnung planktonischer Zellen.....	38
3.2.3.5	Thermisches Abtöten von Bakterien .....	38
3.3	Prüfung der Viabilität und Lebendkeimzahl .....	38
3.3.1	Durchflusszytometrie .....	38
3.3.1.1	Kalibrierung des Durchflusszytometers .....	39
3.3.1.2	Messung der Membranintegrität .....	39
3.3.1.3	Definition des Probevolumens .....	42
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
3.3.3	Ermittlung der Lebendkeimzahl .....	44
3.3.4	Vergleich der Lebendkeimzahl mit der Viabilität.....	45
3.4	Molekularbiologische Untersuchungen.....	45
3.4.1	Entwurf von Oligonukleotiden für die PCR („Primerdesign“)......	45
3.4.2	Gelelektrophorese .....	46
3.4.3	Gewinnung und Quantifizierung von RNA/DNA .....	47
3.4.3.1	Messung des DNA-Gehalts mittels Spektrometrie.....	47
3.4.3.2	Messung des RNA-Gehalts mittels Spektrometrie.....	48

# Inhaltsverzeichnis

3.4.4	PCR.....	48
3.4.5	Quantitative PCR.....	49
3.5	Datenerhebung und Interpretation.....	51
3.5.1	Erstellung der Standardkurve für 16S-rDNA-Mengen.....	52
3.5.2	Erstellung der Standardkurve für cDNA-Mengen .....	53
3.5.3	Zusammenführung der Daten.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Induktion der zu untersuchenden Zustände in <i>Staphylococcus epidermidis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
4.1.1	Lebendkeimzahl und Viabilität nach VBNC-Induktion.....	56
4.1.2	Einfluss der initialen Zelldichte auf die VBNC-Induktion von <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	61
4.1.3	Lebendkeimzahl und Viabilität planktonisch gewachsener Kulturen.....	63
4.1.4	Lebendkeimzahl und Viabilität von in Biofilmen gewachsenen Kulturen .....	65
4.1.5	Lebendkeimzahl und Viabilität thermisch abgetöteter Bakterien .....	68
4.2	Überprüfung der „Primer“ und des DNase-Verdau .....	69
4.3	Erstellung von Standardkurven .....	71
4.3.1	Standardkurve für eine quantitative 16S-rDNA PCR mit genomischer <i>Staphylococcus aureus</i> DNA-Matrize .....	72
4.3.2	Standardkurve für eine quantitative 16S-rDNA PCR mit genomischer <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA-Matrize.....	73
4.3.3	Standardkurve für eine quantitative 16S-rRNA PCR mit komplementärer <i>Staphylococcus aureus</i> DNA-Matrize .....	74
4.3.4	Standardkurve für eine quantitative 16S-rRNA PCR mit komplementärer <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA-Matrize.....	75
4.4	Ergebnisse der 16S- RNA/DNA-Quantifizierung .....	76
5	Diskussion .....	80
5.1	Ziele dieser Arbeit .....	80

## Inhaltsverzeichnis

5.2	Der VBNC-Zustand: Definition, Induktion und Identifikation .....	80
5.3	Normierte RNA Quantifizierung .....	83
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	86
VI.	Thesen.....	88
VII.	Literaturverzeichnis.....	90
VIII.	Lebenslauf .....	100
	Selbstständigkeitserklärung.....	101

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme in Falschfarbendarstellung von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
Abbildung 2 Typische Blasen- und Krustenbildung einer Impetigo Contagiosa auf der Stirn eines Patienten.....	14
Abbildung 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Staphylococcus aureus</i> mit Extrazellulärmatrix.....	16
Abbildung 4 Kultivierbarkeit und Viabilität von <i>Vibrio vulnificus</i> bei VBNC-Induktion.....	18
Abbildung 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Yersinia pestis</i> in kultivierbarem (rechts) und unkultivierbarem Zustand (links).....	19
Abbildung 6 Fluoreszenzmikroskopie von <i>Staphylococcus aureus</i> nach Live/Dead-Färbung.....	22
Abbildung 7 Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener „Forward Scatter“ und „Side Scatter“ einer planktonisch gewachsenen <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur.....	40
Abbildung 8 Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener roter Fluoreszenzintensität gegen Side Scatter einer planktonisch gewachsenen <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur.....	41
Abbildung 9 Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener roter und grüner Fluoreszenzintensität einer planktonisch gewachsenen <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur.....	42
Abbildung 10 Fluoreszenzmikroskopie einer thermisch behandelten <i>Staphylococcus aureus</i> -Kultur.....	44
Abbildung 11 Gegenüberstellung von roter und grüner Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie einer <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur nach 24-stündiger VBNC-Induktion.....	58
Abbildung 12 Gegenüberstellung von mittels Durchflusszytometrie gemessenem „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ einer <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur nach 24-stündiger Inkubation in VBNC-Induktionsmedium.....	59
Abbildung 13 Der Anteil toter Zellen einer <i>Staphylococcus epidermidis</i> -VBNC-Kultur in Abhängigkeit von der initialen optischen Dichte (OD) im Induktionsmedium.....	62
Abbildung 14 Kultivierbarkeit lebender <i>Staphylococcus epidermidis</i> Zellen nach 24-stündiger VBNC-Induktion in Abhängigkeit von der initialen optischen Dichte (OD) im	



## Abbildungsverzeichnis

Induktionsmedium, bestimmt anhand der Anzahl teilungsfähiger Zellen in Folgekulturen auf Blutagarplatten .....	62
Abbildung 15 Die Betrachtung von mittels Durchflusszytometrie gemessenen Side Scatter und Forward Scatter Werten einer planktonisch gewachsenen <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur.....	64
Abbildung 16 Betrachtung der durch Durchflusszytometrie ermittelten Werte von „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ einer als Biofilm gewachsenen <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kultur. ....	67
Abbildung 17 Repräsentatives Gesichtsfeld der Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation von <i>Staphylococcus aureus</i> bei 80°C.....	69
Abbildung 18 Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die mit regulären 16S-rDNA-„Primern“ generiert wurden.....	70
Abbildung 19 Gelelektrophorese von PCR- und T7-Polymerase-Transkriptions- Produkten unter Verwendung von genomischer DNA aus <i>Staphylococcus epidermidis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> .....	71
Abbildung 20 Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rDNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden genomischen <i>Staphylococcus aureus</i> DNA (gDNA).....	72
Abbildung 21 Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rDNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden genomischen <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA (gDNA).....	73
Abbildung 22 Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rRNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden komplementären <i>Staphylococcus aureus</i> DNA (cDNA).....	74
Abbildung 23 Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rRNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden komplementären <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA (cDNA). ....	75
Abbildung 24 Repräsentative Schmelzkurve von Produkten eines spezifischen qPCR-Ansatzes.....	78
Abbildung 25 Vergleich der 16S-rRNA/rDNA-Verhältnisse aller hier untersuchten physiologischen Zustände in <i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....	79
Abbildung 26 Vergleich der 16S-rRNA/rDNA-Verhältnisse aller hier untersuchten physiologischen Zustände in <i>Staphylococcus aureus</i> .....	79

### IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Untersuchte Bakterienstämme .....	26
Tabelle 2 „Primer“ zur molekularbiologischen Untersuchung von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....	27
Tabelle 3 Verwendete Substanzen zur Herstellung von 1 l zehnfach konzentrierte PBS-Lösung.....	28
Tabelle 4 Substanzen zur Herstellung 1 l einer 50x Stammlösung TAE-Puffer. ....	29
Tabelle 5 In dieser Arbeit verwendete Enzyme und „Kits“ .....	29
Tabelle 6 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	30
Tabelle 7 In dieser Arbeit verwendete Software und „Online-Tools“ mit Verwendungszweck.....	31
Tabelle 8 Molare Massen von Nukleotiden zur Berechnung der DNA- und RNA-Massen in Kopienzahlen.....	32
Tabelle 9 Größenstandards für die Kontrolle der Fragmentlänge in der Gelelektrophorese. ....	32
Tabelle 10 In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	33
Tabelle 11 In dieser Arbeit verwendete Einweggefäße und -Behälter .....	34
Tabelle 12 In dieser Arbeit verwendete Reagenzien zur Durchführung einer 16S-rDNA-PCR.....	49
Tabelle 13 Protokoll der PCR-Reaktion zum qualitativen Nachweis von 16S rDNA aus Staphylokokken. ....	49
Tabelle 14 Protokoll der qPCR-Reaktionen für den 16S-rDNA-Nachweis. ....	51
Tabelle 15 Reagenzien für die Durchführung von qPCR-Reaktionen im Rahmen des 16S-rDNA-Nachweises. ....	51
Tabelle 16 Molare Masse der Nukleotide in der Sequenz zur Erstellung einer Standardkurve für 16S-rDNA-Mengenbestimmung .....	53
Tabelle 17 Molare Masse der Nukleotide in der Sequenz zur Erstellung einer Standardkurve für 16S-cDNA .....	54
Tabelle 18 Lebendkeimzahl direkt nach Überführung in das VBNC-Induktionsmedium, spricht vor einer weiteren Inkubation in dem entsprechenden Medium. ....	57
Tabelle 19 Lebendkeimzahl nach 24-stündiger Inkubation in VBNC-Induktionsmedium ...	57
Tabelle 20 Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 24-stündiger VBNC-Induktion .....	60
Tabelle 21 Anteil kultivierbarer Zellen an der Population viabler Zellen der biologischen Replikate nach 24-stündiger VBNC-Induktion .....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 22 Anteil der Zellen im VBNC-Zustand an der Gesamtpopulation nach 24-stündiger VBNC-Induktion .....	61
Tabelle 23 Lebendkeimzahlen aller biologischen Replikate planktonisch gewachsener Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in BHI-Flüssigmedium.....	63
Tabelle 24 Ergebnisse der Durchflusszytometrischen Untersuchung von <i>Staphylococcus epidermidis</i> - / <i>Staphylococcus aureus</i> - Zellen nach 24 h planktonischem Wachstum in BHI-Flüssigmedium .....	65
Tabelle 25 Anteil kultivierbarer <i>Staphylococcus epidermidis</i> - / <i>Staphylococcus aureus</i> - Zellen aller biologischen Replikate nach 24 h planktonischem Wachstum in BHI-Flüssigmedium .....	65
Tabelle 26 Lebendkeimzahlen von aus Biofilmen suspendierten Zellen.....	66
Tabelle 27 Ergebnisse der Durchflusszytometrischen Untersuchung <i>Staphylococcus epidermidis</i> - / <i>Staphylococcus aureus</i> - Zellen aller biologischen Replikate aus Biofilmverbünden.....	67
Tabelle 28 Kultivierbare <i>Staphylococcus epidermidis</i> - / <i>Staphylococcus aureus</i> -Zellen aller biologischen Replikate aus Biofilmverbünden .....	68
Tabelle 29 Verhältnisse der 16S-RNA- zu 16S-DNA-Mengen aller biologischen Replikate von <i>Staphylococcus aureus</i> - und <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Kulturen in allen zu untersuchenden Zuständen .....	77

### V. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
µm	Mikrometer (10 <sup>-6</sup> Meter)
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CFU	Colony Forming Units
CMP	Cytidinmonophosphat
Cp	crossing point
d	desoxy- (etwa in dNTP)
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double-stranded DNA (doppelsträngige DNA)
eDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FSC	forward scatter
g	Gramm
Ggf.	gegebenenfalls
GMP	Guanosinmonophosphat
griech.	Griechisch
h	hour (Stunde)
KnS	Koagulase-negative Staphylokokken
l	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

## Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer ( $10^{-9}$ Meter)
P	P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
Plankt.	planktonisch
PMA	Propidiummonoazid
qPCR	quantitative PCR
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
s	Sekunde
S.	Staphylococcus
s.u.	siehe unten
sog.	sogenannt
SSC	side scatter
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TMP	Thyminmonophosphat
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UMP	Uridinmonophosphat
VBNC	viable but non-culturable
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Kugelbakterium aus der taxonomischen Ordnung der *Bacillales*, und für eine große Vielfalt an Haut und Wundinfektionen verantwortlich. Ein einzelnes Bakterium hat in etwa einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ . Die Bakterien teilen sich in allen drei Ebenen. Wenn sich die Tochterzellen nach der Teilung nicht trennen, entstehen Anordnungen in der Form von Trauben oder Haufen (griech. Staphyle, „die Traube“).

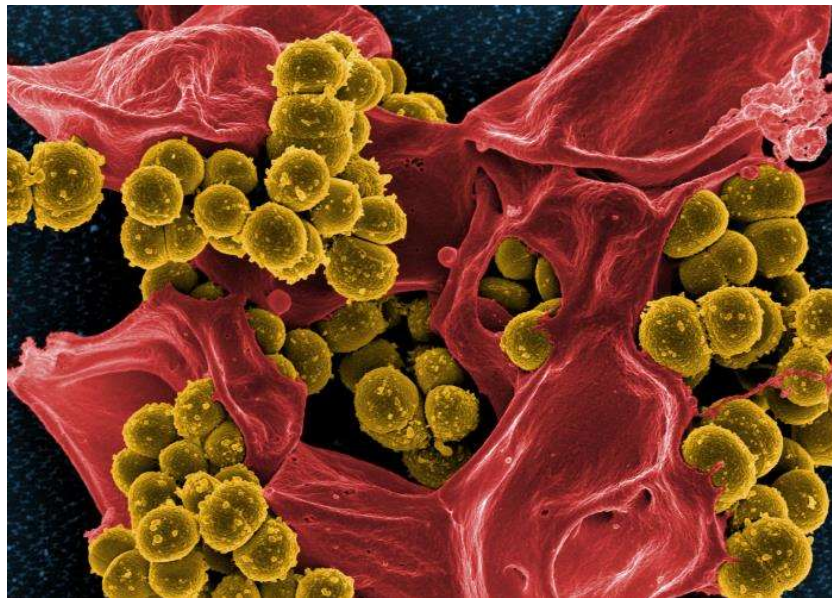


Abbildung 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme in Falschfarbendarstellung von *Staphylococcus aureus*. In Gelb die in Trauben angeordneten Bakterien und in Rot die Pseudopoden eines neutrophilen Granulozyten [1].

Den Beinamen *aureus* (von griech. „golden“) erhielt das Bakterium aufgrund der gelb-orangen Farbe der Kolonien bei Wachstum auf den meisten herkömmlichen Festmedien sowie der goldgelben Krusten welche sich bei der Impetigo contagiosa, einer weit verbreiteten Hautinfektion mit *Staphylococcus aureus*, entwickeln.

## Einleitung

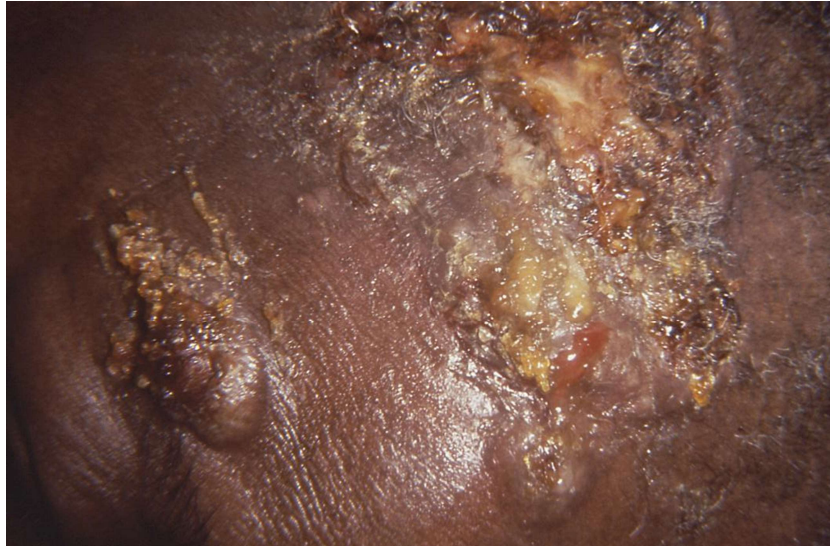


Abbildung 2 Typische Blasen- und Krustenbildung einer Impetigo Contagiosa auf der Stirn eines Patienten [2].

*Staphylococcus aureus* verfügt über eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die es zu einem hochpathogenen Keim machen. Zwei der wichtigsten Virulenzfaktoren stellen die Koagulase und der Clumping-Faktor dar. Koagulase ist ein extrazelluläres Enzym, das direkt Fibrin aus Fibrinogen spaltet [3, 4]. Die Expression von Koagulase wird als Unterscheidungsmerkmal zwischen den hiernach benannten Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus intermedius* sind humanpathogen) und den Koagulase-negativen Staphylokokken (KnS, z.B. *Staphylococcus epidermidis*), welche lange als weniger pathogen galten, genutzt [5].

Der Clumping-Faktor ist ein membranständiges Protein, das direkt an Fibrinogen bindet und zur Bildung von Fibrinpolymeren führt. In der Pathogenese von Krankheiten durch Infektion mit *Staphylococcus aureus* nutzen die Bakterien diese beiden Proteine, um sich durch das Einkapseln in Fibrin der Immunantwort entziehen zu können [6]. Dieser Abkapselungsprozess begünstigt die für *Staphylococcus aureus* Infektionen typische Abszessbildung [7].

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wird häufig als Kontrollpopulation bei Antibiotika-Resistenztestungen verwendet [8].

### 1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Das grampositive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* ist unter den KnS die am häufigsten von Menschen isolierte Spezies.

## Einleitung

*Staphylococcus epidermidis* befindet sich, wie im Namen angedeutet, hauptsächlich auf der menschlichen Haut. Für gesunde Menschen sind diese Erreger meist ungefährlich, weshalb sie lange Zeit als apathogen galten [9]. Inzwischen ist klar, dass *Staphylococcus epidermidis* zu den häufigsten Erregern Katheter- und Implantat-assoziiierter Infektionen gehört [5, 9, 10]. Über die Schiene von Venenverweilkanülen oder zentralen Venenkathetern können diese Bakterien die natürliche Hautbarriere überwinden. Maßgeblich für die Überlebensfähigkeit auf Plastikkathetern ist die Fähigkeit dieser Bakterien Biofilme, d.h. Aggregate aus Bakterien und von denen gebildeter extrazellulärer Substanz (s.u.), auf Oberflächen bilden zu können. Innerhalb dieser Biofilme sind die Bakterien vor Antibiotika sowie dem körpereigenen Immunsystem geschützt. Die dauerhafte Präsenz der Bakterien kann während der Liegezeit des Fremdmaterials im Körper zur Venenreizung oder zur Streuung der Keime über die Blutbahn bis hin zur Sepsis führen [11].

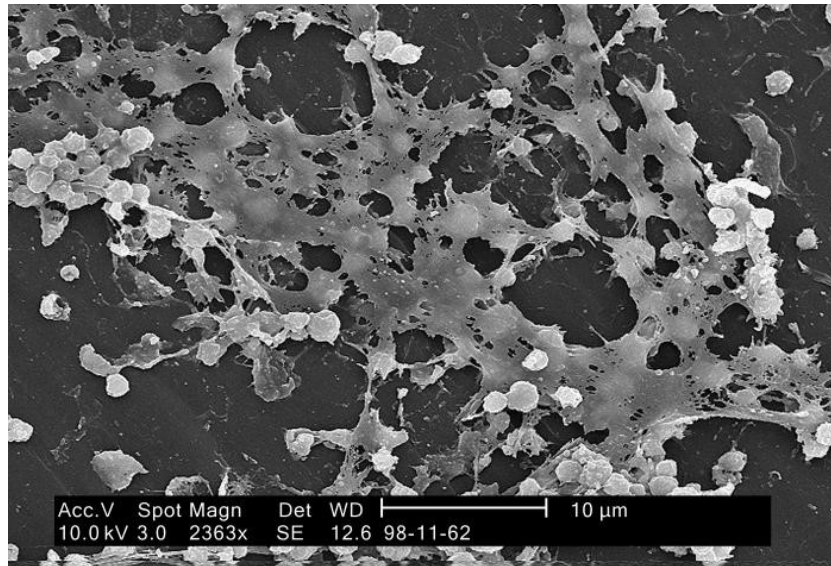
Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm *Staphylococcus epidermidis* 1457 wird häufig für Untersuchungen im Zusammenhang mit Biofilmen verwendet [12].

### 1.3 Biofilme

Biofilme stellen eine phylogenetisch sehr alte Vegetationsform von Mikroorganismen dar [13]. Um sich schädlicher Einflüsse und widrigen Umweltbedingungen zu entziehen besitzen praktisch alle bekannten Bakterienspezies (aber auch viele Protozoen, Pilze oder Algen) die Fähigkeit Biofilme zu bilden. Bekanntestes Beispiel hierbei ist etwa die bakterielle Plaque, die sich bei mangelnder Zahnpflege auf dem Zahnschmelz bildet. Inzwischen ist klar, dass bei praktisch allen chronischen Infektionen, so z.B. bei Katheter- oder Implantat-assoziierten Infektionen, Biofilme vorhanden sind und eine essentielle Rolle beim Überleben der involvierten Keime spielen.



## Einleitung



**Abbildung 3** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus* mit Extrazellulärmatrix. Hell dargestellt sind die in typischen Haufen aggregierten Staphylokokken, grau die Extrazellulärmatrix [14].

Die Genese eines sich de novo entwickelnden Biofilms geht folgendermaßen vonstatten: zunächst haften einzelne Bakterien an einer Oberfläche an. Diese Pionierbakterien bilden zunächst Mikrokolonien, in denen die Bakterien aneinanderhaften, so dass nicht jedes Bakterium an der Oberfläche haften muss und trotzdem mit ihr verbunden ist. Als nächstes bilden die Bakterien eine Extrazellulärmatrix (auch „extrazelluläre polymere Substanzen, kurz: EPS) aus polymeren Kohlenhydraten, aber auch Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (eDNA). Die extrazelluläre Matrix bietet Schutz vor einer Vielzahl an chemischen oder physikalischen Stressoren aus der Umwelt [15, 16].

Biofilme weisen eine komplexe Architektur (siehe dazu die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen) und eine mindestens ebenso komplexe Funktion auf, um den Transport von Nährstoffen und Wasser bis in die innersten Schichten gewährleisten zu können. Außerdem zeigen Biofilme strukturelle Unterschiede zwischen den Randbereichen und ihren innersten Schichten [17, 18].

Auch die Population der in den Biofilm inkorporierten Zellen ist unter natürlichen Umständen heterogen. Zwar geht die Bildung häufig von einer bestimmten Spezies aus, jedoch werden mit dem Wachstum des Biofilms und dem Fortschreiten in spätere Entwicklungsstadien auch andere Bakterienspezies oder Protozoen in den Biofilm integriert [19]. In Biofilmen organisieren sich Bakterienpopulationen und es bilden sich Subpopulationen von Bakterien in verschiedenen metabolischen Zuständen. Das kann zu einer erhöhten Toleranz oder einer Resistenz gegen Antibiotika führen. Hierbei kann es

## Einleitung

auch zur Entstehung von nicht kultivierbaren Subpopulationen von weiterhin lebensfähigen Mikroorganismen kommen (sog. VBNC-Populationen, s.u.) [15, 16, 20–22].

In Biofilmen befinden sich neben den sessilen EPS-bildenden auch mobile Bakterien, die sich vom Rest des Biofilms trennen können, um so neue Kolonien zu bilden. Dieser Ablösungsprozess kann sowohl passiv durch Scherkräfte umgebender Flüssigkeiten oder durch andere physikalische Einflüsse als auch aktiv durch enzymatische Lyse der die jeweiligen Zellen umgebenden EPS eingeleitet werden [19].

### **1.4 Implantat-assoziierte Infektionen**

Die in Abhängigkeit von der Liegezeit schicksalhaft erfolgende mikrobielle Besiedlung von Kathetern stellt ein großes Problem in der Medizin dar. Die Katheter ermöglichen einen direkten Zugang durch die natürlicherweise geschlossene Hautbarriere. Infektionen bis hin zur Sepsis können die Folge sein.

Im Zusammenhang mit Implantaten wie etwa einer Hüftprothese können auch Infektionen mit Biofilmbildung auf dem Implantat entstehen, die noch Wochen bis Jahre nach der Implantation zur Lockerung der Prothese führen können [23–25].

Die im Biofilm im Vergleich zum planktonischen Wachstum verminderte Wachstumsrate kommt den Erregern zu Gute, da die Erreger nur mit minderer Kraft abgewehrt werden und die so eher larviert verlaufenden Infektionen erst spät erkannt werden. Zudem bedingt der verringerte Stoffwechsel der Biofilm-organisierten Bakterien, dass diese weniger zugänglich für übliche Antibiotika-basierte Therapieansätze sind [15, 16, 26].

Sollte hierdurch die Behandlung der Infektion so weit erschwert werden, dass keine antibiotische Therapie ausreichend wirksam ist, kann es zur Amputation von infizierten Gliedmaßen oder zu einer gesteigerten Letalität durch Sepsis und Organversagen kommen [11, 27–29].

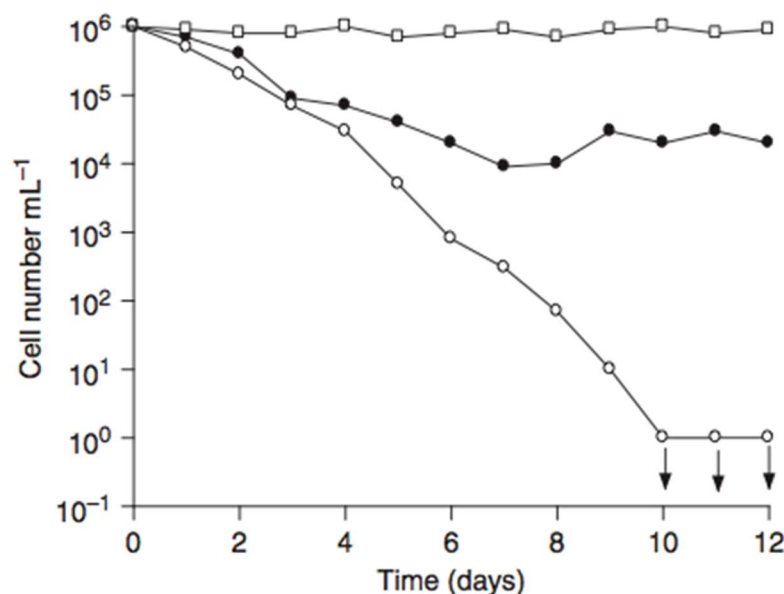
### **1.5 Der VBNC-Zustand**

Der Goldstandard für die Erkennung der Anwesenheit von Bakterien auf bestimmten Materialien ist nach einer Probennahme und Aufbringen der Probe auf bzw. in ein Nährmedium der Nachweis von sichtbar wachsenden Kolonien bzw. einer Trübung des Mediums. Jedoch besitzen einige Bakterienspezies die Fähigkeit unter Umweltstress in

## Einleitung

einen Zustand überzugehen, in dem sie zwar noch lebensfähig sind, jedoch aufgrund fehlenden Wachstums nicht mehr auf herkömmlichen Festmedien nachgewiesen werden können. Dieser Zustand wird als viable-but-non-culturable (kurz: VBNC) bezeichnet [30, 31]. In diesem Zustand weisen die betroffenen Zellen einen veränderten Stoffwechsel und eine erhöhte Toleranz gegenüber physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen auf [30, 32–34]. Nach Erstbeschreibung des VBNC-Zustandes wurde festgestellt, dass sich Bakterien im VBNC-Zustand von anderen bekannten Ruhezuständen (Sporenbildung) durch einen noch nachweisbaren Rest-Metabolismus unterscheiden [34].

Für die Induktion dieses Zustandes ist eine Reihe von Faktoren ausschlaggebend. Besonders scheint das Angebot an Nährstoffen eine große Rolle zu spielen [35–38] aber auch die Temperatur, der pH, oxidativer Stress und weitere Stressfaktoren aus der Umgebung [39–56]. Der Kontakt mit menschlichem Serum sowie die Anwesenheit von Antibiotika können ebenfalls den VBNC-Zustand induzieren [57].



**Abbildung 4 Kultivierbarkeit und Viabilität von *Vibrio vulnificus* bei VBNC-Induktion.** Beispielhaft anhand von *Vibrio vulnificus* verdeutlichtes Schema der Entstehung von VBNC-Zellen mit der Zeit bei Inkubation unter Induktionsbedingungen, ● zeigt die Menge der als lebend identifizierten Zellen, ○ zeigt die kultivierbaren Zellen, □ zeigt die gesamte Zellzahl, [30]

## Einleitung

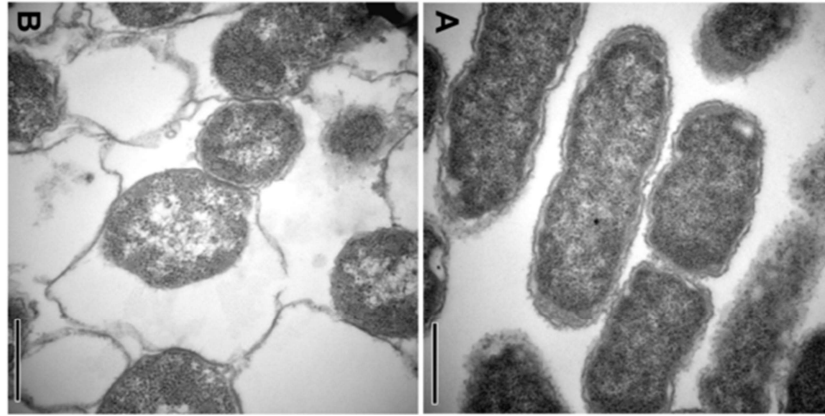


Abbildung 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Yersinia pestis* in kultivierbarem (rechts) und unkultivierbarem Zustand (links). Zu sehen ist die sphärische und kleinere Form der Zellen im VBNC-Zustand. [58]

Zusätzlich zu diesen metabolischen Veränderungen unterziehen sich manche Bakterienarten einem morphologischen Wandel, indem sie eine kleinere, sphärische Form annehmen [32, 34, 59–64].

Ein weiteres wichtiges Merkmal des VBNC-Zustandes ist die Wiederbelebarkeit dieser zunächst nicht kultivierbaren Zellen in einen voll funktionsfähigen kultivierbaren Zustand. Dies erfolgt meist unter der kontrollierten und wohldosierten Wiederaufnahme von Nährstoffen oder einer anderweitigen Anpassung der Wachstumsbedingungen an das optimale Milieu für das Bakterium (pH-Wert, Temperatur) [42, 45, 50, 52, 54, 65–70].

Das initiale Ausbleiben von Wachstum auf Fest- bzw. in Flüssigmedien in Verbindung mit der Möglichkeit des Wiedererlangens der Fähigkeit zum Wachstum und der Virulenz stellt eine Herausforderung für die Qualitätskontrolle in der Lebensmittelindustrie und für die Diagnostik in der Medizin dar, da sich Infektionen unter diesen Umständen nicht mehr mit herkömmlichen Methoden nachweisen lassen [71].

Der VBNC-Zustand muss von anderen Anpassungsmechanismen unterschieden werden. So können Bakterien auch einen Zustand reduzierten Stoffwechsels einnehmen, ohne dabei ihre Fähigkeit zur Bildung von Kolonien zu verlieren. Hierzu wurden sogenannte „Persister Cells“ beschrieben, welche eine Behandlung mit Antibiotika überleben und nach Entfernen des Antibiotikums ohne Latenzphase das Potential zur Koloniebildung aufweisen [72]. Diese Eigenschaft ist nicht mit klassischen Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika gleichzusetzen, wie man es z.B. bei MRSA-Keimen beobachtet, sondern es handelt sich um einen Zustand, in dem die Zellen durch den verminderten Stoffwechsel vorübergehend tolerant gegenüber Antibiotika werden [72, 73]. Die Definitionen von

## Einleitung

Persister-Zellen und Zellen im VBNC-Zustand gehen fließend ineinander über. Dies macht eine sichere Unterscheidung zwischen diesen beiden Zuständen nahezu unmöglich [32, 41, 73–75]. Insofern ist davon auszugehen, dass es sich um den gleichen Anpassungsmechanismus in verschiedenen Ausprägungsgraden handelt [32, 35, 57, 73, 76].

Die Untersuchung von Biofilmen ergab, dass bereits ohne signifikanten Umweltstress in größeren Bakterienpopulationen Subpopulationen im VBNC-Zustand oder als Persister-Zellen bestehen [32, 41, 74, 75, 77].

Die Differenzierung gegenüber exponentiell wachsenden Zellen ist klar möglich. So wurde in Proteomuntersuchungen gezeigt, dass sich das Genexpressionsmuster von Bakterien im VBNC-Zustand von dem exponentiell wachsender Zellen signifikant unterscheidet [36, 78–81].

Häufig wird für die *In-vitro*-Induktion des VBNC-Zustandes das Inkubieren von Bakterienkulturen bei 4 °C in nährstoffarmem Seewasser (kurz ASW = Artificial Sea Water) genutzt [38, 82]. Mit Sicht auf Bakterienspezies, die im Zusammenhang mit Katheterinfektionen stehen (z.B. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*), gelingt die Überführung in den VBNC-Zustand dagegen eher durch Inkubation in menschlichem Serum nach Hinzuführen von Antibiotika [54, 55, 83]. Solche Induktionsmethoden gehen jedoch häufig mit dem Abtöten eines wesentlichen Anteils der untersuchten Bakterienpopulation einher.

Für *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wurden bisher nur wenige Untersuchungen unternommen, um die Expression bestimmter Gene im VBNC-Zustand mit der Expression derselben in anderen Zuständen desselben Bakterienstammes wie etwa planktonischer Zellen oder bakterieller Zellen aus einem Biofilmverbund zu vergleichen. In Bezug auf andere Bakterienspezies konnte jedoch gezeigt werden, dass der VBNC-Zustand keine reine Reduktion des bakteriellen Metabolismus mit sich bringt, sondern dass einige Gene auch verstärkt exprimiert werden [47, 49, 63, 80, 81, 84, 85].

### **1.6 Quantifizierungsmethoden für lebende bakterielle Zellen**

Die Definition der Zustände tot und lebend ist im Zusammenhang mit Infektionen, bei denen herkömmliche Quantifizierungsmethoden für Bakterien versagen, von großer Bedeutung.

## Einleitung

Die Bestimmung der Lebensfähigkeit einer Zelle kann durch den Nachweis einer Vielzahl von Merkmalen durchgeführt werden.

Die in der klinischen Diagnostik bakterieller Erkrankungen am häufigsten angewandte Form des Nachweises lebendiger Zellen ist die Quantifizierung mittels serieller Verdünnung einer Zellsuspension und Ausplattierung von Aliquots auf Agarplatten. Hierbei können jedoch lediglich jene Zellen quantifiziert werden, die die Fähigkeit zur Zellteilung behalten haben. Sollten einzelne Zellen diese Fähigkeit durch einen Übergang in das VBNC-Stadium (vorübergehend) verloren haben, werden sie durch diese Methode nicht mehr erfasst. Daher werden auch andere Merkmale als Surrogatparameter für die Lebensfähigkeit einer Zelle verwendet.

Dies sind beispielsweise die Aktivität bestimmter nur in lebenden Zellen enthaltener Enzyme wie etwa Laktatdehydrogenase [86–88] oder die Fähigkeit bestimmte Farbstoffe über Transportsysteme der intakten Zellmembran in die Zelle zu transportieren. Umgekehrt gilt auch, dass die intakte Zellmembran messbar bestimmte Farbstoffe am Eindringen in die Zelle hindert [89, 90].

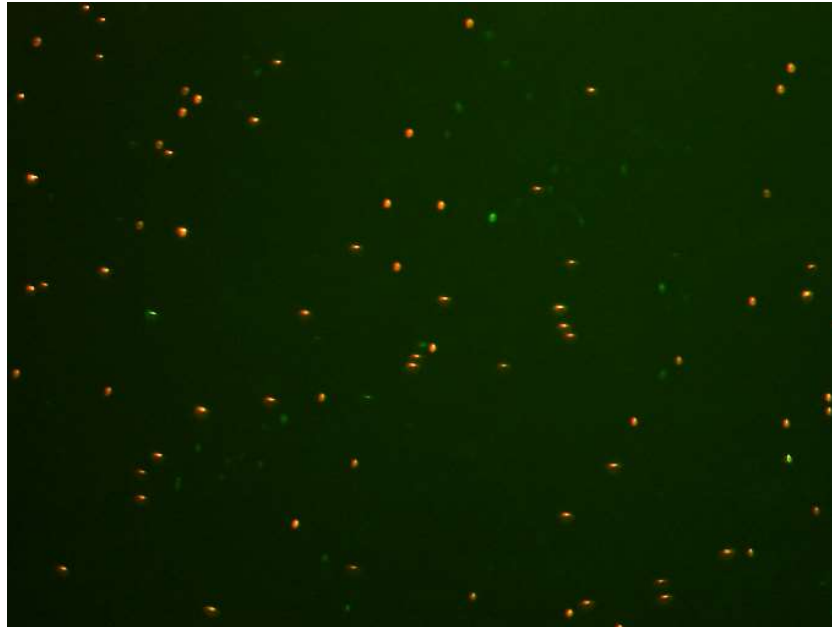
Um eine bessere Aussagekraft dieser Assays zu erreichen, werden häufig Kombinationen aus mehreren Methoden eingesetzt, wenn eine möglichst genaue quantitative Aussage über den Anteil lebender, toter oder Zellen, die sich in einem Zustand dazwischen befinden, benötigt wird.

Dennoch wird die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (kurz CFU = Colony-Forming-Units) in Wachstumsversuchen als Näherungswert für die Lebendkeimzahl einer Bakterienpopulation verwendet. „Lebendkeimzahl“ ist hier also als die Menge an teilungs- und wachstumsfähigen Zellen definiert. Für den Zweck dieser Arbeit wird der Begriff „Lebendkeimzahl“ in der gängigen Definition angewandt, auch wenn der Begriff nicht alle relevanten Qualifikationsmerkmale lebendiger Zellen beschreibt.

Die Prüfung der Membranintegrität wird häufig als alternatives Maß für die (Über-) Lebensfähigkeit einer Zelle herangezogen. Um diese zu prüfen, werden Farbstoffe verwendet, die meist an die DNA binden und in bestimmten Spektren fluoreszieren. Ungehindert membrangängige Farbstoffe werden hierbei genutzt, um die DNA aller Zellen unabhängig von ihrer Lebensfähigkeit zu markieren. Zusätzlich werden nicht membrangängige Farbstoffe wie etwa Propidiumiodid (PI) genutzt, um Zellen zu färben, deren Zellmembran Farbstoffmolekül-gängige Löcher aufweist (sogenannte „Live/Dead-

## Einleitung

Färbung“). Das rot fluoreszierende PI markiert somit alle als tot anzunehmenden Zellen. Anschließend kann entweder manuell unter einem Fluoreszenzmikroskop oder per Durchflusszytometrie der Anteil der Zellen mit unterschiedlicher Färbung bestimmt werden [90].



**Abbildung 6** Fluoreszenzmikroskopie von *Staphylococcus aureus* nach Live/Dead-Färbung. Rot erscheinen Bakterien mit beschädigter Zellmembran, da die grüne Fluoreszenz (SYTO9) von der roten (Propidiumiodid) überdeckt wird. Zellen mit intakter Membran fluoreszieren grün, da nur der grüne Farbstoff die intakte Zellmembran überwinden kann.

Eine weitere elegante Methode zur Quantifizierung lebender Zellen ist der Einsatz der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR, nicht zu verwechseln mit der ebenfalls häufig RT abgekürzten Reverse-Transkriptase-PCR). Da für die Durchführung einer PCR die undifferenzierte Lyse jeglicher Zellen notwendig ist, muss sichergestellt werden, dass während der Reaktionszyklen nicht die DNA toter Zellen amplifiziert wird. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen vor der Lyse mit Propidiummonoazid (PMA) versetzt. PMA ist ein intakte Membranen nicht durchdringender dsDNA-bindender Farbstoff, der selektiv in die DNA von Zellen mit defekter Zellmembran interkaliert und somit deren Amplifikation während einer anschließenden PCR verhindert. Somit wird nur die DNA uneingeschränkt lebensfähiger Zellen quantifiziert [91–94]. Allerdings dringt PMA in Konzentrationen über 5% auch in intakte Zellen ein und ist somit nur bedingt für die Verwendung von Viabilitäts-Messungen geeignet [95].

## Einleitung

Die aktuell genaueste Methode zur Messung der Lebensfähigkeit einer Zelle ist der Nachweis der Genexpression. Hierbei wird die transkribierte RNA aus den Zellen isoliert und anschließend per reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, um so die Matrize für die anschließende qPCR zu generieren. Diese Methode ist arbeitsaufwändig und aufgrund des Hantierens mit labiler RNA anfällig für Störgrößen [96].

### 1.7 Das 16S-rRNA-Gen

Die 16S-rRNA ist eine Komponente der 30S Untereinheit von Ribosomen in Prokaryoten. In der Phylogenetik findet das zugehörige Gen Verwendung als sogenanntes „Housekeeping-Gen“ zur taxonomischen Klassifizierung von Prokaryoten, da es im Genom stark konserviert ist [97–99]. Bei der Untersuchung von Genexpressionsmustern wird die Expression des meist mehrfach pro Genom vorliegenden Gens, also die Menge an 16S-rRNA als Referenz für die Expressionsstärke anderer Gene verwendet, da es über verschiedenen metabolische Zustände hinweg auf einem relativ stabilen Niveau exprimiert wird [85]. Sollte die stabile Expression eines solchen Referenzgenes nicht gegeben sein kann dies die Ergebnisse von Expressionsanalysen anderer Gene verfälschen [100]. Bei der Untersuchung der Genexpression anderer Bakterienspezies im VBNC-Zustand konnte bereits heterogene Expressionsmuster für die 16S-rDNA gezeigt werden [36, 45, 101].

### 1.8 Ziele dieser Arbeit

Bei der Behandlung von Implantat-assoziierten Infektionen ist die Bestimmung des ursächlichen Erregers ggf. schwierig. Grund kann zum einen eine bereits begonnene Antibiotikatherapie sein, die die Bakterien ihrer Vermehrungsfähigkeit beraubt. Um diese Limitation zu überwinden, sollen Proben erst nach einer Karenzzeit nach einer Unterbrechung / Beendigung der Antibiotikatherapie von 14 Tagen gewonnen werden und die Proben auf mindestens drei fest- und in mindestens zwei Flüssigmedien inokuliert werden.

Zum anderen kann ein Übertritt der bei dieser Art von Infektion typischerweise Biofilm-organisierten Erreger in den VBNC-Zustand die Ursache für frustrane Kultivierungsversuche sein.

Um Keime unabhängig von ihrer Wachstumsfähigkeit nachweisen zu können, wird der Nachweis bakterieller DNA genutzt. Bestünde eine Möglichkeit mittels qPCR dem



## Einleitung

nachgewiesenen Keim auch einen bestimmten metabolischen Zustand zuschreiben zu können, so fiele die Einschätzung der Relevanz für die Klinik des Patienten leichter.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zu prüfen, ob mit molekularbiologischen Methoden zwischen verschiedenen metabolischen Zuständen desselben Bakterienstammes unterschieden werden kann.

Der Metabolismus von Bakterien unterscheidet sich je nachdem in welchem Zustand oder in welcher Umgebung sie sich befinden. Wenn ein Organismus seinen Metabolismus an seine Umgebungsbedingungen anpasst, so setzt dies eine Veränderung des Genexpressionsmusters voraus. Sowohl die Auswahl an Genen, die exprimiert werden, als auch die Intensität dieser Expression wird hierbei verändert. Abhängig von der Genexpressionsintensität liegen also zu einem gegebenen Zeitpunkt mehr oder weniger Kopien der zu einem Gen korrespondierenden mRNA im Organismus vor. Das Verhältnis der DNA-Menge eines bestimmten Gens zur korrespondierenden mRNA kann somit Aufschluss darüber geben, wie stark die Expression dieses Gens zum Zeitpunkt der Lyse einer Bakterienpopulation war. Dieser Umstand kann genutzt werden, um molekularbiologisch zwischen metabolisch hochaktiven (z.B. in planktonisch wachsenden Bakterien) und weniger metabolisch aktiven Zuständen unterscheiden zu können.

Im ersten Schritt sollte daher in dieser Arbeit eine Methode zur zuverlässigen Induktion des VBNC-Zustandes in *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* etabliert werden. Zwar sind in der Literatur viele Protokolle zur Induktion des VBNC-Zustandes beschrieben, jedoch beziehen sie sich nur in wenigen Fällen auf Staphylokokken [38, 54, 57, 67, 82, 102]. Zudem besteht durch die fehlende Möglichkeit Zellen in verschiedenen metabolischen Zuständen innerhalb einer Kultur voneinander zu trennen, der Bedarf für ein Versuchsprotokoll, mit dem möglichst alle Zellen einer Kultur in einen gleichartigen metabolischen Zustand überführt werden können. Nur so kann eine molekularbiologische Untersuchung dieser Kultur eine klare Aussage über die Genexpression eines bestimmten metabolischen Zustandes treffen.

In einem zweiten Schritt sollten die zu untersuchenden Keime in verschiedenen metabolischen Zuständen auf die Expression von 16S-rDNA untersucht werden. Hierfür sollte die zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Zellen befindliche mRNA für dieses Gen mit der Menge an korrespondierender DNA verglichen werden. Für die Quantifizierung von DNA und RNA sollte die qPCR benutzt werden. Das Ziel ist es, eine Aussage über die

## Einleitung

Eignung von 16S-rDNA als Referenzgen für Genexpressionsanalysen bzw. als Diskriminationsfaktor zwischen dem VBNC-Zustand, planktonisch wachsenden Zellen, Zellen aus einem Biofilmverbund und thermisch abgetöteten Zellen treffen zu können.

## 2 Material

Im Folgenden werden die für die Versuchsreihen notwendigen Materialien aufgelistet. Der Übersichtlichkeit halber werden in diesem Kapitel bereits die Zubereitungsschritte der später verwendeten Kulturmedien und Pufferlösungen erwähnt.

### 2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Bezeichnung der Bakterienstämme	Herkunft/Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Stammsammlung, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock, Rostock/[8]
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457	Dr. H. Rohde, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie & Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg/[12]

**Tabelle 1** Untersuchte Bakterienstämme . *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wird häufig als Kontrollpopulation in Antibiotika-Resistenztestungen verwendet. *Staphylococcus epidermidis* 1457 wird häufig für Untersuchungen im Zusammenhang mit Biofilmen verwendet. Alle Versuche wurden gleichartig mit beiden Stämmen durchgeführt.

### 2.2 Oligonukleotide („Primer“)

Die verwendeten „Primer“ sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Beide Primerpaare wurden sowohl für die Untersuchung der Genexpression von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 als auch *Staphylococcus epidermidis* 1457 verwendet.

Die verwendeten „Primer“ wurden von der Firma Eurogenetics bezogen.

Bezeichnung Oligonukleotide	der Sequenz der Oligonukleotide	Verwendung
16sRNA_Exp_R	TTAAACCACATGCTCCACCG	„Reverse Primer“ für qPCR zur Erstellung von Standardkurven
16sRNA_T7_Exp_F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGT</u> GATGAAGGTCTTCGGATCG	„Forward Primer“ für qPCR zur Erstellung von Standardkurven
16sRNA_R	GTAATACGTAGGTGGCAAGC	„Reverse Primer“ für qPCR zur Datenerhebung
16sRNA_F	GGAGTGCTTAATGCGTTAGC	„Forward Primer“ für qPCR zur Datenerhebung

Tabelle 2 „Primer“ zur molekularbiologischen Untersuchung von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen den Teil des „Primers“, der als T7-Promoter dient. Die fettgedruckte Base kennzeichnet die erste transkribierte Base.

## 2.3 Kulturmedien

### 2.3.1 BHI-Medium

Für die Kultivierung von *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wurde BHI-Flüssigmedium verwendet (Brain Heart Infusion, Fisher Scientific GmbH, Schwerte). Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.3.2 BHI-Agar

Für die Kultur der Bakterien auf Festmedium wurden BHI-Agar-Platten hergestellt. Zur Herstellung wurden 400 ml regulären BHI-Mediums verwendet, 6 g Agar Technical No.3 (LP0013, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) hinzugefügt und anschließend autoklaviert. Der autoklavierte Agar wurde bis zur Herstellung der Agarplatten in einem Warmwasserbad gelagert.

Zur Herstellung der Agarplatten wurden jeweils ca. 20 ml des BHI-Agars in Petrischalen gegossen und für ca. 12 h getrocknet. Die Platten wurden anschließend bei 4 °C zur späteren Verwendung gelagert.

## Material

### 2.3.3 Blutagarplatten

Für die Kultivierung von Bakterienstämmen und mittelfristige Lagerung (bis zu 14 Tage) zur späteren Beimpfung von Flüssigmedien wurden Columbia-Blutagarplatten (5 %) (BD Biosciences GmbH, Heidelberg) verwendet.

### 2.3.4 PBS-Medium

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Medium = Phosphate buffered saline) wurde verwendet, um Bakterienkulturen zu waschen und um Verdünnungsreihen herzustellen. Zunächst wurde eine zehnfach konzentrierte PBS-Lösung hergestellt, die dann für den späteren Gebrauch verdünnt wurde.

Die Substanzen für 1 l zehnfach konzentrierte PBS-Lösung werden in **Tabelle 3** aufgeführt.

Chemische Substanz	Stoffmenge (mol)
KCl	0,027
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,020
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100
NaCl	1,370

**Tabelle 3** Verwendete Substanzen zur Herstellung von 1 l zehnfach konzentrierte PBS-Lösung. Die Substanzen wurden 1 l aqua dest. hinzugefügt und anschließend mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt.

Die Lösung wurde anschließend vor dem Autoklavieren mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt. Bei Bedarf wurde die Lösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und erneut autoklaviert, um eine einfache Lösung zur Verwendung in Versuchsreihen herzustellen.

## 2.4 TAE Puffer

Zur Durchführung von Gelelektrophoresen wurde eine 50x Stammlösung TAE-Puffer angelegt. Die Stoffmengen der benötigten Substanzen sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

## Material

Substanz	Stoffmenge (mol)
Tris base	2
Essigsäure	1
EDTA	0,05

Tabelle 4 Substanzen zur Herstellung 1 l einer 50x Stammlösung TAE-Puffer

Bei Bedarf wurde die Lösung 1:50 mit Aqua dest. verdünnt, um eine einfache Lösung zur Verwendung in der Gelelektrophorese herzustellen.

## 2.5 Enzyme und Testgebinde („Kits“)

Die verwendeten Enzyme und „Kits“ sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Bezeichnung der Enzyme und Testgebinde	Hersteller
10x PCR-Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
dNTPs	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability and Counting Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
MAXIsript in vitro Transkription Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Qubit RNA HS Assay Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Superscript VILO cDNA Synthesis Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
SurePrep RNA/DNA/Protein Purification kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
SYBR Green Master Mix	QIAGEN GmbH, Hilden
Taq-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden

Tabelle 5 In dieser Arbeit verwendete Enzyme und „Kits“

## 2.6 Chemikalien

Alle verwendeten und bislang nicht erwähnten Chemikalien sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

## Material

Bezeichnung der Chemikalien	Hersteller
6x Gel Loading Dye	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
6xMassRuler Loading Dye	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Agar Technical No.3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BD FACSFlow (Trägerflüssigkeit für die Durchflusszytometrie)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Brain Heart Infusion	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tickopur TR 3 (Emulgierender Spezial-Reiniger für die Ultraschallanwendung)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Trizma base (Tris base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 6 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

## 2.7 Software und „Online-Tools“

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Softwareprogramme und „Online-Tools“ sind mit Angabe des Verwendungszweckes in **Tabelle 7** aufgeführt.

Bezeichnung der Software	Verwendungszweck
BZ observation tool, BZ Image analysis application	Analyse und Bearbeitung von Bildern aus Fluoreszenzmikroskopie
CellQuest Pro	Analyse von FACS-Daten
LightCycler 480 Analysis Software, Version 1.5	Analyse von qPCR Daten
<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	BLAST- Gen-Alignment
<a href="http://www.primerfox.com">http://www.primerfox.com</a>	Primer-Design
Picodrop v2.08	Spektrometrie
SPSS 20	T-Test
<a href="http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr">http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr</a>	Verifizierung der Kopienzahl

Tabelle 7 In dieser Arbeit verwendete Software und „Online-Tools“ mit Verwendungszweck

## 2.8 Größenstandards

Für die Umrechnung der DNA bzw. RNA-Masse wurden die Massen für Nukleotide der RÖMPP-Online-Enzyklopädie entnommen. Für die Berechnung der Kopienzahl an doppelsträngiger DNA wird häufig vereinfachend eine durchschnittliche Masse von 650 g/mol angenommen. Um eine genaue Umrechnung in eine Kopienzahl zu gewährleisten, wurden die exakten Molmassen der einzelnen Moleküle verwendet. In **Tabelle 8** sind die verwendeten Massen der Nukleotide dargestellt.

Nukleotid	Molare Masse (g/mol)
dAMP	331,22
dCMP	307,20
dGMP	347,2
dTMP	322,2
AMP	347,2
CMP	323,2
GMP	363,2
UMP	324,3



## Material

Tabelle 8 Molare Massen von Nukleotiden zur Berechnung der DNA- und RNA-Massen in Kopienzahlen.

Um in der PCR die Größe der Produkte zu kontrollieren, wurden DNA-Standards als Referenz verwendet. Sie sind in **Tabelle 9** aufgeführt.

Bezeichnung der Größenstandards	Hersteller
MassRuler Express Forward DNA Ladder Mix	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
O'GeneRuler 1 kb	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 9 Größenstandards für die Kontrolle der Fragmentlänge in der Gelelektrophorese.

## 2.9 Geräte und Hilfsmittel

In **Tabelle 10** sind die wesentlichen verwendeten Geräte aufgezählt.

## Material

Bezeichnung der verwendeten Geräte	Hersteller
BD FacsCalibur	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Biozero, kompaktes Fluoreszenzmikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank KBWF 240	BINDER GmbH, Tuttlingen
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Multipette Plus Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Glasperlen (Durchmesser: 2,85-3,45mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lightcycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH 720, pH-Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH, Weilheim
Pipetman P10- Präzisionspipette	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn
Pipetman P1000-präzisionspipette	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn
Pipetman P200-Präzisionspipette	Gilson International B.V., Limburg an der Lahn
Qubit 2.0 Fluorometer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
S1 Pipette Filler	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Sonorex Digital 10P Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH, Berlin
TPersonal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Varifuge 3.0R	Heraeus holding GmbH, Hanau

**Tabelle 10** In dieser Arbeit verwendete Geräte

In **Tabelle 11** sind die verwendeten (Einweg-) Gefäße und Behälter aufgelistet. Petrischalen, Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen und 1,5 bzw 2,0 ml Reaktionsgefäße wurden nach einmaliger Verwendung entsorgt. Pipettenspitzen wurden vor der Verwendung autoklaviert.

## Material

Bezeichnung	der	verwendeten	Hersteller
<b>Einwegmaterialien</b>			
100 µl-Pipetten-Spitzen			Greiner Bio-One GmbH, Essen
1000 µl-Pipetten-Spitzen			Greiner Bio-One GmbH, Essen
1000 ml Laborglasflasche			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
100 ml Laborglasflasche			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
100 ml Messbecher (Glas)			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
200 µl-Pipetten-Spitzen			Greiner Bio-One GmbH, Essen
25 ml Serologische Pipette			Greiner Bio-One GmbH, Essen
400 ml Messbecher (Glas)			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
500 ml Laborglasflasche			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
1000 ml Laborglasflasche			DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
50 ml Zentrifugenröhrchen, steril			Greiner Bio-One GmbH, Essen
Columbia Blutagar 5% Petrischalen			BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Eppendorf 10 ml Combitips Advanced Biopur Pipetter Tips			Eppendorf AG, Hamburg
Roti-Store Cryoröhrchen			Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sterile Petrischalen 92x16 mm			Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Sterile Petrischalen 92x20 mm			Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht

**Tabelle 11 In dieser Arbeit verwendete Einweggefäße und -Behälter**

### **3 Methodik**

Dieses Kapitel beschreibt die grundlegende Vorgehensweise in den verschiedenen Schritten zur Ermittlung der Genexpression. Auf die Ergebnisse der in diesem Kapitel beschriebenen Zwischenschritte wird im Kapitel Ergebnisse eingegangen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden sowohl mit *Staphylococcus aureus* als auch mit *Staphylococcus epidermidis* gleichartig durchgeführt.

#### **3.1 Stammhaltung**

Beide untersuchten Stämme wurden zur langfristigen Konservierung in Glycerinlösung bei -80 °C gelagert. Hierfür wurden mit einer Impföse Einzelkulturen von einer BHI-Agar-Kultur in Stammhaltungsröhrchen mit 1ml 30 %iger Glycerinlösung übertragen und eingefroren. Für die mittelfristige Konservierung wurden Blutagarplatten mit den Stämmen beimpft und anschließend bei 37 °C für 12 h inkubiert. Die Blutagarplatten wurden nach der Kultivierung luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert. Alle 14 Tage wurde eine Kolonie entnommen und auf eine neue Blutagarplatte geimpft, um eine hinreichende Menge an vermehrungsfähigen Bakterien sicher zu stellen. Nach dreimaligem Passagieren wurde eine neue Kultur aus der Stammsammlung angelegt.

#### **3.2 Bakterienkultivierung**

##### **3.2.1 Vorkulturen**

Für sämtliche Wachstumsversuche wurden zuvor Übernachtskulturen angefertigt. Die Übernachtskulturen wurden in BHI-Medium (20-25 ml) bei 37 °C über Nacht in 50 ml-Röhrchen inkubiert. Anschließend wurden Aliquots dieser Vorkulturen als Vertreter planktonisch gewachsener Zellenpopulationen zur weiteren Diagnostik bei -80 °C eingefroren. Zur Induktion von Biofilmbildung oder des VBNC-Zustandes wurden diese restlichen Kulturen anschließend in verschiedenen Induktionsmedien verdünnt und inkubiert.

### 3.2.2 Die Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Übernachtskulturen und anderer Zellsuspensionen wurde bei 600 nm erfasst. Es wurde immer zunächst ein Leerwert des entsprechenden Mediums eingelesen. Überschreitet die optische Dichte einen Wert von 1,0, wurde mit demselben Medium in definierten Verhältnissen (1:1, 1:5, 1:10) verdünnt, da die Messungen bei Dichte-Werten über 1,0 nicht mehr linear mit der Zellzahl korrelieren.

### 3.2.3 Wachstumsversuche

#### 3.2.3.1 Induktion des VBNC-Zustandes

Bei der Induktion von Bakterienkulturen in den VBNC-Zustand war es wichtig, einen möglichst geringen Anteil an Bakterien in anderen Zuständen (kultivierbar oder tot) in der Kultur vorzufinden. Da es an der technischen Möglichkeit fehlte diese Subpopulationen voneinander zu trennen, waren nur Ergebnisse aus metabolisch möglichst einheitlichen Kulturen in der Genexpressionsuntersuchung aussagekräftig. Für die Induktion war es daher notwendig Medien zu verwenden, die einerseits möglichst viele Bakterien am Leben erhielten und andererseits deren Kultivierbarkeit dennoch einschränkten. Als ideal erwies sich ein Medium, das sowohl nährstoffarm war als auch moderaten pH-Stress (pH 6,0) ausübte.

Für die Einstellung des pH-Wertes wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet. Um eine annähernd isotone Lösung für die Staphylokokken zu schaffen, wurden 100 ml der 1-molaren Pufferlösung mit 0,8 %-iger NaCl-Lösung auf 1000 ml aufgefüllt.

Für die Überführung der Bakterien in den VBNC-Zustand wurden Zellen einer Übernachtskultur mittels Zentrifugation sedimentiert, mit PBS gewaschen, ein weiteres Mal sedimentiert und anschließend in dem VBNC-Medium suspendiert. 1 l VBNC-Medium wurde mit Zellen der Übernachtskultur beimpft und die OD der Suspension auf 0,1 eingestellt. Eine solch geringe optische Dichte war notwendig, da sich bei höheren Dichten von 0,5 oder 1,0 ein schnelleres Absterben der Bakterien ergab, was bezüglich der Lebensfähigkeit der Bakterien zu inhomogenen Kulturen führte (siehe 4.1.2). Das große Volumen der Kultur sollte trotz der geringen optischen Einsaatdichte eine ausreichende Menge an Zellen zur DNA/RNA–Untersuchung sicherstellen.

## Methodik

Die VBNC-Kultur wurde über 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf den Zellgehalt und die Membranintegrität der Bakterien überprüft.

### 3.2.3.2 Konzentrierung von VBNC-Zellen

Zur Konzentrierung der 1000 ml VBNC-Kultur nach beendeter Inkubation wurden Aliquots in 50 ml Röhrchen transferiert und anschließend bei 4000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Anschließend wurde dasselbe Röhrchen mit weiteren 50 ml der VBNC-Kultur aufgefüllt. Das Röhrchen wurde geschüttelt, um das zuvor gewonnene Sediment in der zugegebenen Kulturlösung zu resuspendieren. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation. Diese Schritte wurden wiederholt bis die gesamte Zellmenge der VBNC-Kultur in einem Röhrchen sedimentiert war. Dieses Sediment wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Abgießen des Überstandes wurde das Zellsediment zur späteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.3.3 Kultivierung und Ernte von Biofilmzellen

Zur Kultivierung von Biofilmen wurden je Stamm zwei hochrandige Petrischalen jeweils mit 5 ml unverdünnter Übernachtskultur in BHI-Bouillon befüllt und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Biofilm vorsichtig mit 1 ml PBS überspült, ohne diesen dabei zu lösen. Hierbei sollten etwaige noch vorhandene planktonische Zellen entfernt werden, um eine möglichst reine Kultur von ausschließlich in den Biofilm integrierten Zellen zu erhalten.

Nach dem Waschschrift wurden je Petrischale 2 ml sterilfiltrierter PBS-Lösung hinzugefügt, der Biofilm mittels eines sterilen Schabers gelöst und als Zellsuspension in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt.

Um eine Messung einzelner Zellen im Durchflusszytometer zu ermöglichen, wurden die suspendierten Biofilmzellen aus zwei Petrischalen in einem Reagenzglas gesammelt und für 10 s bei 64 W in einem Ultraschallbad behandelt. Hierbei sollte die Extrazellulärmatrix weitestgehend gelöst werden, während die Zellen möglichst unbeschadet blieben. 100 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend in 1900 µl PBS für die Durchflusszytometrie verdünnt. Die restliche Zellsuspension wurde in sterile 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C für die spätere Bearbeitung eingefroren.

### 3.2.3.4 Gewinnung planktonischer Zellen

Für die Gewinnung lebender planktonisch gewachsener Bakterien wurden 20 ml BHI-Medium in 50 ml-Röhrchen mit Einzelkolonien des entsprechenden Stammes beimpft und für 8 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 x 2 ml der Kultur in sterile 2 ml Reaktionsgefäße überführt, bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und wiederum sedimentiert. Anschließend wurden die Sedimente bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.3.5 Thermisches Abtöten von Bakterien

Um Referenzwerte von Bakterien zu erhalten, die keine Genexpression vollziehen können, wurden Übernachtskulturen beider verwendeten Stämme gezielt thermisch abgetötet. Die Übernachtskulturen wurden hierfür in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 60 min bei 80 °C und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

## 3.3 Prüfung der Viabilität und Lebendkeimzahl

Um die Viabilität und Kultivierbarkeit von Bakterienpopulationen aus verschiedenen Kultivierungsversuchen zu überprüfen, wurden die Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung der Membranintegrität sowie Plattierung von Zellsuspensionen auf BHI-Agar zur Ermittlung der Lebendkeimzahl eingesetzt.

### 3.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Induktion des VBNC-Zustandes ist zu erwarten, dass nicht alle Zellen diesen Zustand zur gleichen Zeit einnehmen. Außerdem kommt es bei einzelnen Zellen auch zum Zelltod. Um zu ermitteln wie hoch der Anteil kultivierbarer lebender Zellen in einer Kultur ist, wurden mittels Durchflusszytometrie die absolute Menge an lebenden und toten Bakterien ermittelt und anschließend mit der Anzahl mit der Lebendkeimzahl verglichen.

Mit der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen auf ihre Größe, Granularität und Oberflächenbeschaffenheit untersucht werden. Dies erfolgt durch die Bestrahlung mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge im flachen und rechten Bestrahlungswinkel. Die Streuung des Lichtes gibt dann Aufschluss über die Beschaffenheit des Untersuchungsobjektes. Die bei Bestrahlung im rechten Winkel entstehende Lichtstreuung („Side Scatter“ = SSC) gibt Aufschluss über Granularität der Zellen. Die Lichtstreuung bei Bestrahlung im flachen Winkel („Forward Scatter“ = FSC) gibt hingegen Aufschluss über

## Methodik

das Volumen der Zellen. Durchflusszytometer verfügen außerdem über die Möglichkeit die natürliche bzw. Farbstoff-induzierte Fluoreszenz einzelner Zellen zu untersuchen. Hierfür stehen mehrere Kanäle zur Verfügung, die die zu untersuchende Zelle mit unterschiedlichen Lichtspektren anregen und die Intensität der entstehenden Fluoreszenz registrieren.

### 3.3.1.1 Kalibrierung des Durchflusszytometers

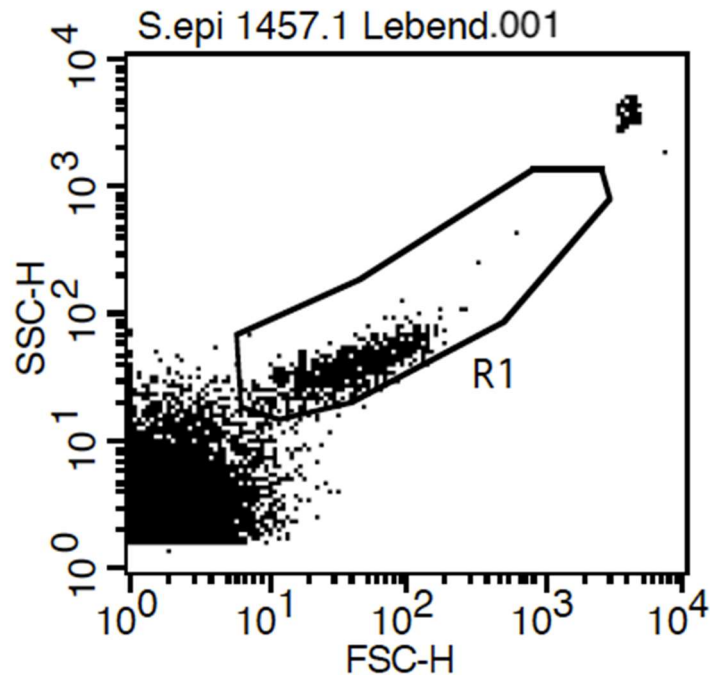
Um eine Messung der Membranintegrität mit dem Durchflusszytometer zu ermöglichen, wurden zunächst Kalibrierungen der Stromspannung des Exzitationslasers durchgeführt. Damit konnten die Größen- und Granularitätsbereiche der zu untersuchenden Bakterien normiert und mittig auf Skalen abgebildet werden.

Hierfür wurden Proben aus planktonisch gewachsenen Kulturen entnommen und gemessen. Da durch die Induktion des VBNC-Zustandes eine Veränderung der Zellgröße zu erwarten war, wurden die Skalen so eingerichtet, dass die Punktwolke für planktonisch gewachsene Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase etwa mittig auf der Skala für „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ erschien (siehe 3.3.1.2, **Abbildung 8**).

### 3.3.1.2 Messung der Membranintegrität

In einer Bakteriensuspension können auch korpuskuläre Verunreinigungen vorkommen. Außerdem kann es im Rahmen der VBNC-Induktion zum Zerfall sterbender und abgestorbener Zellen in Zellfragmente kommen. Um in der Fluoreszenzanalyse keine Zellfragmente oder korpuskuläre Verunreinigungen fälschlicherweise als intakte bakterielle Zellen zu identifizieren, wurde nach jeder Messung zunächst der „Side Scatter“ gegen den „Forward Scatter“ aufgetragen (**Abbildung 7**).





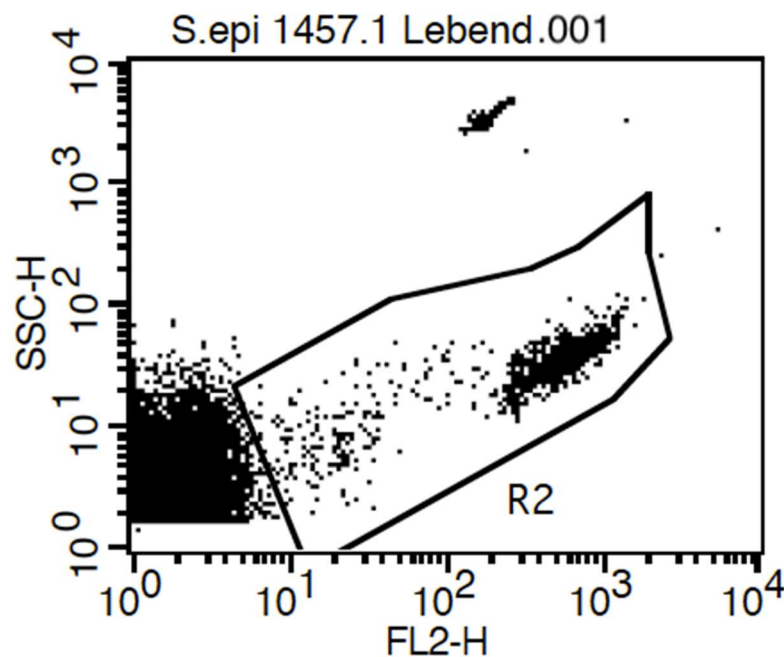
**Abbildung 7** Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener „Forward Scatter“ und „Side Scatter“ einer planktonisch gewachsenen *Staphylococcus epidermidis*-Kultur. In den Punktwolken wurde eine Region R1 definiert, in der sich die intakten Zellen wiederfanden. Diese Region wurde dann in anderen Messungen genutzt, um auch für diese die Signale anderer intakter Zellen vollständig zu registrieren. In der oberen rechten Ecke ist die Punktwolke für die der Messung zugesetzten Referenzkorpuskel („Counting Beads“) zu sehen. Diese Punktwolke wurde als R5 (in dieser Abbildung nicht sichtbar) definiert und diente als Begrenzung für das Messvolumen.

Auf der Basis einer Referenzgrafik für lebende *Staphylococcus epidermidis* Zellen wurde innerhalb der Punktwolken ein Bereich R1 festgelegt, der die intakten Zellen vollständig enthielt. Für alle zukünftigen Messungen wurde postuliert, dass intakte Zellen ebenfalls zu Messwerten in diesem Bereich führen. Diese Region R1 wurde als Bedingung („Gate“) für weitere Messungen verwendet. Das heißt, es wurden ausschließlich Messereignisse („Events“) in weiteren Analysen berücksichtigt, welche sowohl die Granularität als auch die ungefähre Größe von planktonisch gewachsenen Staphylokokken aufwiesen. Bei kleinen Lageabweichungen der gegenüber der Umgebung weiterhin klar abgrenzbaren Punktwolke wurde R1 für jede der Messungen der aktuellen Lokalisation der Punktwolke geringfügig angepasst.

Zusätzlich musste sichergestellt werden, dass nur tatsächlich gefärbte Partikel in den Untersuchungen der Fluoreszenz von Propidiumiodid und SYTO9 als „Events“ dargestellt wurden. Hierzu wurde separat der Side Scatter gegen den Messwert für die Intensität der

## Methodik

rot/gelben Fluoreszenz des ungebundenen Propidiumiodids (FL2-H) der LIVE/DEAD-Färbung aufgetragen (PI ändert bei Interkalierung in den DNA-Strang sein Emissionsspektrum). In der resultierenden Grafik wurde eine weitere Region R2 identifiziert, die Partikeln mit einer intensiven roten Fluoreszenz entspricht. Diese Region wurde als zweites „Gate“ für die Gegenüberstellung der Fluoreszenz von SYTO9 und Propidiumiodid verwendet. So konnten etwaig ungefärbte Partikel in späteren Messungen von der Auswertung ausgeschlossen werden (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8** Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener roter Fluoreszenzintensität gegen Side Scatter einer planktonisch gewachsenen *Staphylococcus epidermidis*-Kultur. Um ungefärbte Reaktionspartner von der Untersuchung auszuschließen, wurde der Side Scatter (SSC-H) gegen rote/gelbe Fluoreszenz (FL2-H) aufgetragen. Daraus resultiert die Definition einer Region R2. Diese umfasst die Korpuskel mit hoher Intensität dieser Fluoreszenz. Somit ist die Zellpopulation definiert, welche mit Propidiumiodid gefärbt wurde.

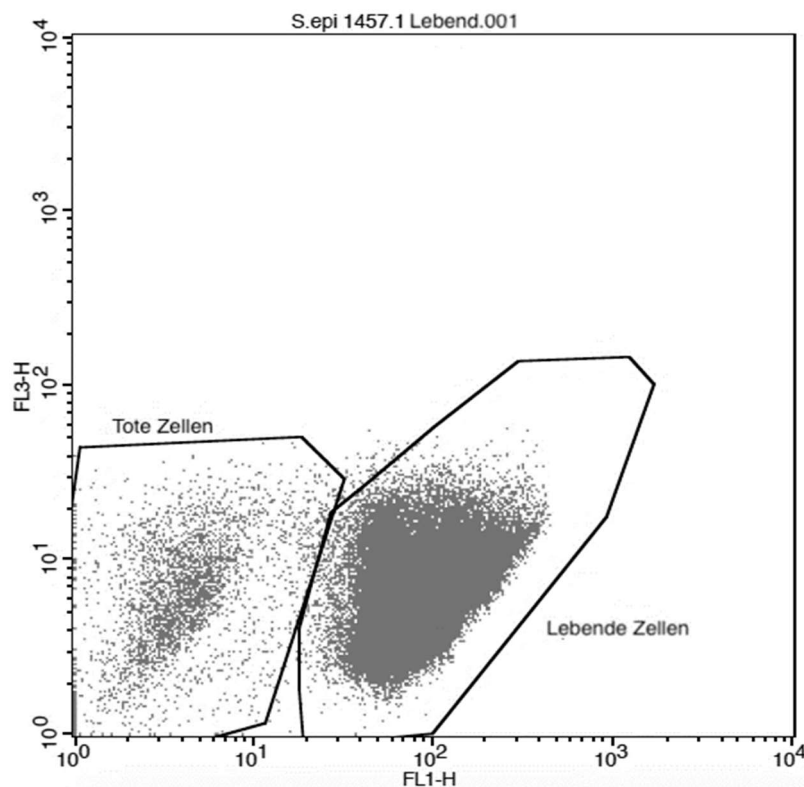
Schließlich wurde die Messwerte aus der grünen Fluoreszenz des SYTO9-Farbstoffes gegen die der roten Fluoreszenz des gebundenen Propidiumiodid (PI, FL3-H) aufgetragen, um zwischen toten und lebenden Zellen in der Gesamtpopulation unterscheiden zu können.

Um als valides „Event“ aus dieser Messung registriert zu werden, musste eine Zelle sowohl im „Gate“ R1 als auch im „Gate“ R2 erfasst werden. Somit wurden nur „Events“

## Methodik

gewertet, die sowohl dem Größenbereich der intakten Staphylokokken als auch der Intensität erfolgreich angefärbter Korpuskeln entsprachen.

In der Gegenüberstellung der Messwerte von grüner und roter Floreszenz wurden nun die den zuvor definierten Regionen entsprechenden Punktwolken ausgezählt, wobei die Punktwolke mit der höheren Intensität der grünen Fluoreszenz als Region für die lebenden Bakterien und die Punktwolke mit der niedrigeren Intensität als Region für die Zellen mit kompromittierter Membranintegrität definiert wurde (**Abbildung 9**).



**Abbildung 9** Beispielhafte Auftragung von mittels Durchflusszytometrie gemessener roter und grüner Fluoreszenzintensität einer planktonisch gewachsenen *Staphylococcus epidermidis*-Kultur. Der letzte Schritt der Durchflusszytometrie von LIVE/DEAD-gefärbten Bakterien bestand im Auftragen von roter (FL3-H) gegen grüne Fluoreszenz (FL1-H). In die Wertung gelangten nur Messpunkte, die in einem zuvor gesetzten Gate lagen. Damit wurde sichergestellt, dass nur Messergebnisse verglichen werden, die sowohl dem Größenbereich der zu untersuchenden Bakterien als auch der Fluoreszenzintensität erfolgreich gefärbter Korpuskeln entsprechen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).

### 3.3.1.3 Definition des Probevolumens

Um die Messwerte zur Membranintegrität mit denen der Lebendkeimzählung vergleichen zu können, wurde der Bakteriensuspension Referenzkorpuskel aus Latex („Counting

## Methodik

Beads“) in einer Menge von  $10^5$  /ml zugefügt. Beim Auftragen der SSC- gegen die FSC-Werte wurde dann eine weitere Region R5 definiert, die den „Counting Beads“ entsprechenden Punktwolke zuzuordnen war. Sie fand sich regelhaft in der rechten oberen Ecke der graphischen Abbildung der Messwerte (**Abbildung 7**). Sobald 10.000 Ereignisse in dieser Region gemessen wurden, wurde die Messung abgeschlossen. So konnte sichergestellt werden, dass stets 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension gemessen wurden. Dies entsprach dem gleichen Volumen, das zum Ausplattieren auf Agarplatten verwendet wurde. Somit war ein direkter Vergleich der Lebendkeimzahl mit der durchflusszytometrisch bestimmten Zahl an Zellen mit intakter Zellmembran möglich.

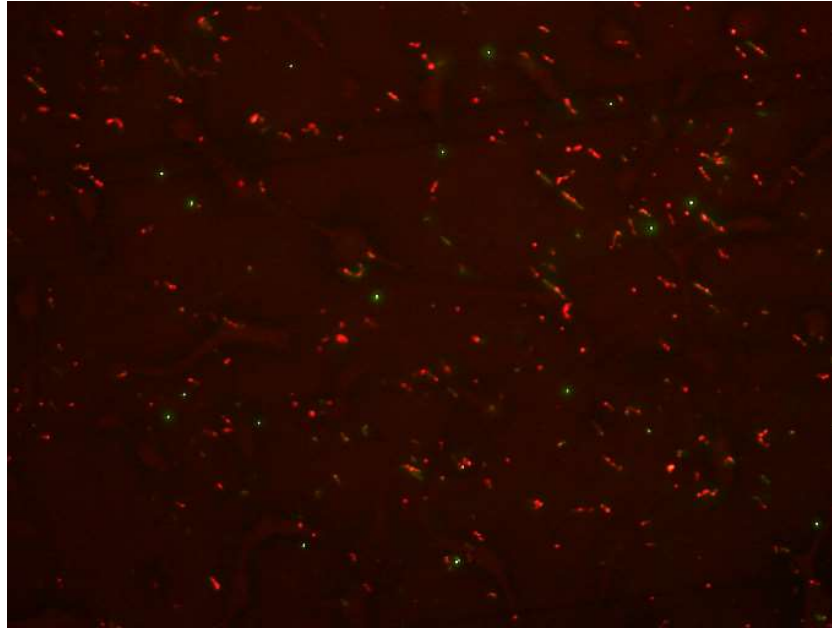
### 3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das erfolgreiche Abtöten der Bakterien wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nach einer LIVE/DEAD-Färbung festgestellt. Hierfür wurden SYTO 9 und PI zunächst unter lichtarmen Verhältnissen in gleichen Teilen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1  $\mu$ l Färbemischung zu 1 ml Bakteriensuspension.

5  $\mu$ l der gefärbten Bakterienlösung wurden auf Objektträger übertragen und mittels eines Deckglases fixiert.

In der Fluoreszenzmikroskopie wurden Filter verwendet, die Licht mit den Wellenlängen von 470 nm und 515 nm auf den Sensor des Mikroskops lassen. Somit konnte in einem Untersuchungsgang sowohl die grüne als auch die rote Fluoreszenz der Zellen beurteilt werden. Dabei wurden Zellen, die sowohl mit SYTO9 als auch mit PI gefärbt wurden, im mikroskopischen Aspekt als rot fluoreszierend wahrgenommen (**Abbildung 10**).

Es wurden je Probe 3 Gesichtsfelder stichprobenartig auf grün fluoreszierende Zellen untersucht.



**Abbildung 10** Fluoreszenzmikroskopie einer thermisch behandelten *Staphylococcus aureus*-Kultur. In der Fluoreszenzmikroskopie weisen Zellen mit intakter Zellmembran nach LIVE/DEAD-Färbung eine grüne Fluoreszenz und Zellen mit defekter Zellmembran eine rote Fluoreszenz auf. Diese Aufnahme wurde nach Inkubation der Zellen bei 80 °C angefertigt und zeigt somit überwiegend abgetötete Zellen.

### 3.3.3 Ermittlung der Lebendkeimzahl

Die Lebendkeimzahl wurde durch Ausplattierung von Aliquots aus Bakterienzellsuspensionen auf Blutagar bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Bakteriensuspension bis zu einer Verdünnung von  $1/10^9$  erstellt. Zur Verdünnung wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße autoklaviert und jeweils mit 900  $\mu$ l steriler PBS-Lösung befüllt. Es wurden zur Erstellung der Verdünnungsreihe 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Bakteriensuspension in eines der mit 900  $\mu$ l PBS vorbefüllten Reaktionsgefäße überführt und durch Aufsetzen auf den Laborschüttler vermischt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l in das nächste vorbefüllte Reaktionsgefäß überführt. Diese Schritte wurden bis zur letzten Verdünnungsstufe fortgeführt. Die Blutagarplatten wurden entsprechend ihrer Verdünnungsstufe beschriftet und mit autoklavierten Glasperlen befüllt. Nach Hinzufügen von jeweils 100  $\mu$ l der verdünnten Bakteriensuspension wurden die verschlossenen Blutagarplatten vorsichtig geschüttelt, um mittels der Glasperlen und sachtem Schwenken der Agarplatten die Bakteriensuspension gleichmäßig auf dem Agar zu verteilen. Anschließend wurden die Glasperlen vorsichtig in eine alkoholische Lösung zum Desinfizieren und Reinigen gekippt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über 24 h

## Methodik

inkubiert. Abschließend wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Es wurden für jede untersuchte Probe die Lebendkeimzahl aller Verdünnungsstufen ausgezählt, bei denen die Koloniedichte dies zuließ. Dann wurde das geometrische Mittel aus den drei geringsten Verdünnungsstufen mit auszählbaren Kolonien gebildet. Das geometrische Mittel der ausgezählten Kolonien wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um die absolute Anzahl an koloniebildenden Bakterien in 1 ml Bakteriensuspension zu erhalten.

### **3.3.4 Vergleich der Lebendkeimzahl mit der Viabilität**

Um auszuwerten, wie hoch der Anteil der tatsächlich vorhandenen und strukturell intakten Bakterien war, der nach den verschiedenen Kultivierungsmethoden noch Kolonien bilden konnte, wurde die ermittelte Lebendkeimzahl mit der Anzahl an Bakterien mit intakter Zellmembran in der durchflusszytometrischen Messung verglichen. Die Differenz entsprach der Menge an Zellen im VBNC-Zustand. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Anteil an toten Zellen in der Bakterienkultur möglichst gering war, um die Verzerrung der Ergebnisse hinsichtlich des Verhältnisses von RNA zu DNA gering zu halten. Des Weiteren musste beachtet werden, dass genügend Zellen vorhanden waren, um eine Untersuchung des RNA- und DNA-Gehaltes der Zellen durchführen zu können.

## **3.4 Molekularbiologische Untersuchungen**

### **3.4.1 Entwurf von Oligonukleotiden für die PCR („Primerdesign“)**

Für die Durchführung von PCR und qPCR (siehe 3.4.4 und 3.4.5) werden Oligonukleotide („Primer“) benötigt. Diese binden bei einer permissiven Temperatur spezifisch an komplementäre Zielsequenzen in einzelsträngigen DNA-Molekülen. Die so entstandenen kurzen Doppelstrangabschnitte dienen als Ansatzort für DNA-Polymerasen, die dann vom 3'-Ende des Doppelstrangabschnitts ausgehend den DNA-Doppelstrang komplettieren und dabei den DNA-Einzelstrang als homologe Matrize nutzen.

Für die molekularbiologische Untersuchung wurden zwei Primerpaare verwendet. Beide binden spezifisch an die 16S-rDNA Gensequenzen in *Staphylococcus aureus* 25923 und

## Methodik

*Staphylococcus epidermidis* 1457. Einer der „Primer“ trug im 5'-Bereich seiner Sequenz eine T7-Promotersequenz, die für die Erstellung der cDNA-Standardkurve genutzt wurde (siehe 3.5.2).

Als Referenzkeim für das „Primerdesign“ wurden *Staphylococcus epidermidis* 12228 und *Staphylococcus aureus* N315 verwendet. Die Genomsequenzen wurde der NCBI Gendatenbank entnommen. Um sichergehen zu können, dass beide Primerpaare sowohl für *Staphylococcus epidermidis* 1457 als auch für die Untersuchung von *Staphylococcus aureus* 25923 verwendet werden konnten, wurden die Gensequenz der 16S-rDNA von *Staphylococcus epidermidis* 12228 mit der von *Staphylococcus aureus* N315 per Gegenüberstellung homologer Sequenzbereiche miteinander verglichen. Da die betreffenden Genomsequenzen zu über 99 % und die Primersequenzen absolut deckungsgleich waren, wurden für beide untersuchten Stämme dieselben Primerpaare eingesetzt.

Das Primerdesign und die Berechnung der Annealing-Temperaturen wurde mit Hilfe des Onlinetools „Primerfox“ durchgeführt.

### 3.4.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer Molekülgröße und der damit korrespondierenden Ladung. Abhängig von diesen Parametern wandern Moleküle beim Anlegen einer Spannung langsamer oder schneller durch ein gepuffertes Gel. Nach einer Färbung mit Ethidiumbromid werden die Moleküle anschließend in ultraviolettem Licht sichtbar. Auf diese Weise kann z.B. nachgewiesen werden, ob nach einer PCR Produkte im Sinne doppelsträngiger DNA entstanden sind und ob diese ausschließlich eine Länge / Größe aufweisen bzw. ein Gemisch unterschiedlicher Produkte darstellen. Daneben können mit dieser Technik jegliche andere Nukleotidfragmente, d.h. einzelsträngige oder doppelsträngige DNA bzw. RNA, mit unterschiedlicher Sensitivität nachgewiesen werden.

Die Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit für folgende Zwecke eingesetzt:

1. Zur Prüfung der Reinheit von RNA-Isolaten
2. Zur Prüfung des DNase-Verdaus nach Transkription von DNA in RNA oder RNA-Isolation
3. Zur Überprüfung der korrekten Größen / Längen von PCR-Produkten

In allen Fällen wurden Gele aus 2 % Agarose-Anteil verwendet. Die Elektrophorese wurde für ca. 40 min bei 90 V in TAE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 20 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt. Nach Spülen in einem Wasserbad wurde das Gel unter einer Schwarzlichtlampe (312 nm Wellenlänge) fotografiert und anschließend entsorgt.

### **3.4.3 Gewinnung und Quantifizierung von RNA/DNA**

Für die Untersuchung der Genexpression musste sowohl RNA als auch DNA isoliert werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erreichen, musste sowohl RNA als auch DNA aus der gleichen Population an Bakterien isoliert werden.

Die Effizienz des RNA-Isolationsverfahrens des verwendeten Kits wurde einmalig auf die vollständige Trennung der DNA von der RNA überprüft. Hierfür wurde mit der mittels des Kit hergestellten RNA-Lösung eine PCR durchgeführt, um etwaige noch vorhandene DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mittels Gelelektrophorese auf die Anwesenheit von PCR-Produkten untersucht. In dieser wurden eine Probe der RNA-Lösung vor und nach der PCR sowie eine Probe der isolierten DNA nach PCR miteinander verglichen.

Das SurePrep Isolationskit wurde für jede Isolation gleichartig eingesetzt. In einigen Fällen wurde jedoch nur DNA isoliert. Hierbei wurde nach der Isolation der DNA das Protokoll abgebrochen und das übrige Zelllysate verworfen.

Die DNA-Lösungen wurden für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C eingefroren, da bei höheren Temperaturen auch unterhalb des Nullpunktes spontane Degradierungsprozesse zu erwarten sind.

#### **3.4.3.1 Messung des DNA-Gehalts mittels Spektrometrie**

Nach jeder DNA-Isolation oder PCR wurde die Konzentration der DNA-Lösung mittels Spektrometrie geprüft. Hierfür wurde das Picodrop Photospectrometer verwendet. Die Spektrometrie beruht auf der Absorption von Licht unterschiedlicher definierter Wellenlängen durch DNA und RNA. Anhand der Absorption dieser Wellenlängen beim Durchtritt einer mit Analyt befüllten Küvette kann entsprechend des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration des gesuchten Moleküls im Analyten berechnet werden.



## Methodik

Anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde sichergestellt, dass keine störenden Verunreinigungen durch Proteine bestanden.

### 3.4.3.2 Messung des RNA-Gehalts mittels Spektrometrie

RNA-Konzentrationen in Lösungen mussten z.B. für die Erstellung einer Standardkurve für die Herstellung von cDNA bestimmt werden (siehe **3.5.2**).

Um in Transkriptionsversuchen die Menge an RNA nach DNase-Verdau zu überprüfen, wurde das QUBIT RNA-Assay verwendet. Hierfür wurde die zu untersuchende RNA-Lösung verdünnt, da das Qubit-Photospektrometer lediglich in einem Bereich bis etwa 500 ng/ml korrekt misst. Für die Messung wurde ein Aliquot von 10 µl mit Arbeitslösung auf 200 µl verdünnt und in das Gerät pipettiert. Die tatsächliche RNA-Konzentration wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors anhand der gemessenen RNA-Konzentration berechnet.

### 3.4.4 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) dient der schnellen und gezielten Replikation ausgewählter DNA-Abschnitte.

Für die Erstellung von Standardkurven wurden definierte 16S-rDNA-Fragmente in hinreichend hoher Konzentration benötigt. Diese Fragmente wurden mittels PCR hergestellt und nach spektrophotometrischer Konzentrationsbestimmung durch serielle Verdünnung in PBS als Referenzlösungen verwendet (siehe **3.5.1**).

Das PCR-Reaktionsgemisch wurde wie in **Tabelle 12** zusammengestellt.

Reagenz	Menge (µl)
Aqua dest.	32,1
„Primer“-Mischung	10
10xPuffer	5,0
DNA-Matrix	2,0
dNTP-Mischung	0,5
Taq-Polymerase	0,4
Gesamtvolumen	50

Tabelle 12 In dieser Arbeit verwendete Reagenzien zur Durchführung einer 16S-rDNA-PCR.

Das PCR-Protokoll wurde wie in **Tabelle 13** festgelegt:

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)
1. Initiale Denaturierung	95	180
2. Zyklische Denaturierung	95	30
3. Zyklische Primerbindung (Annealing)	60	30
4. Zyklische Elongation	72	135
5. Terminale Elongation	72	300
6. Kühlung nach Abschluss der Reaktion	8	dauerhaft

Tabelle 13 Protokoll der PCR-Reaktion zum qualitativen Nachweis von 16S rDNA aus Staphylokokken. Nach der initialen Denaturierung wurden die Phasen 2-4 34 Mal zyklisch wiederholt bevor die Phasen 5 und 6 abschließend durchgeführt wurden.

Es wurden 34 Zyklen der Reaktionsphasen 2-4 durchgeführt, bevor die PCR beendet wurde und die Reaktionslösung bis zur weiteren Verwendung auf 8 °C gekühlt wurde.

### 3.4.5 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) wird zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die qPCR für die Erstellung der Standardkurven und für die Untersuchung des RNA/DNA-Verhältnisses aus den zu untersuchenden Bakterienkulturen gleichartig durchgeführt.

## Methodik

Das Versuchsprinzip beruht auf dem folgenden Phänomen: sofern während der PCR fluoreszierende Farbstoffe in die generierte DNA eingelagert werden und die Farbstoffmoleküle in stets nicht limitierender Menge für die Reaktion zur Verfügung stehen, steigt während der Zyklen einer PCR die Fluoreszenzintensität des in den Doppelstrang interkalierten Farbstoffes proportional zur Menge der neu synthetisierten DNA. Anhand der Anzahl an Zyklen, die es braucht, bis die Fluoreszenz der markierten Moleküle erstmals signifikant die Eigenfluoreszenz aller in der Reaktion vorhandenen DNA-Moleküle übersteigt, kann auf die ursprünglich vorhandene Menge an spezifischer Ziel-DNA rückgeschlossen werden. Der Zyklus im Reaktionsablauf, in dem dies geschieht, wird als Cp-Wert (Crossing Point) bezeichnet.

Als Doppelstrang interkalierender Farbstoff für die Markierung der neu generierten DNA-Moleküle wurde SYBR Green verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert im interkalierten Stadium mit anderer Wellenlänge als im ungebundenen Stadium.

Im Anschluss an die Zyklen zur DNA-Replikation wurde eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt um sicherzustellen, dass ausschließlich das gesuchte Fragment repliziert wurde. Das Prinzip der Schmelzkurve beruht darauf, dass doppelsträngige DNA unterschiedlicher Länge und / oder unterschiedlicher Sequenz bei unterschiedlichen Temperaturen in zwei Einzelstränge denaturiert. Hierbei werden die in Doppelstränge interkalierten SYBR Green-Farbstoffmoleküle freigesetzt. Da SYBR Green durch Interkalation sein Emissionsspektrum ändert, kann hierbei eine Änderung des Spektrums und der Intensität des Fluoreszenzsignals registriert werden. Bei langsamem Erhitzen auf 95 °C werden bei der graphischen Auswertung der Messwerte also drastische Änderungen der Fluoreszenzwerte sichtbar, wenn ein bestimmtes Fragment seine Denaturierungstemperatur erreicht hat. Ist nur eine solche Änderung im Fluoreszenzspektrum nachweisbar, so kann davon ausgegangen werden, dass bei der qPCR nur Produkte einer Länge entstanden sind.

Das qPCR-Protokoll wurde wie in **Tabelle 14** festgelegt.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)
1. Initiale Denaturierung	95	300
2. Zyklische Denaturierung	95	20
3. Zyklisches Annealing	54	20
4. Zyklische Elongation	72	20
5. Terminale Kühlung	40	10
6. Schmelzwertbestimmung	95	
7. Kühlung	37	dauerhaft

**Tabelle 14 Protokoll der qPCR-Reaktionen für den 16S-rDNA-Nachweis.** Nach der initialen Denaturierung wurden die Phasen 2-4 50 Mal zyklisch wiederholt bevor die Phasen 5-7 abschließend durchgeführt wurden. Phase 6 besitzt keine klar definierte Dauer, da sie beendet wurde, sobald eine Temperatur von 95 °C erreicht wurde.

Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches lautet in diesem Fall wie in **Tabelle 15** dargelegt.

Reagenz	Menge (µl)
2xSYBR-Green Master Mix	12,5
16S-Primer	5,0
DNA-Matrix	7,5
Gesamtvolumen	25

**Tabelle 15 Reagenzien für die Durchführung von qPCR-Reaktionen im Rahmen des 16S-rDNA-Nachweises**

Für Negativkontrollen wurde das Volumen für die DNA-Matrix-Lösung durch Aqua dest. ersetzt. Des Weiteren wurden komplette Negativkontrollproben hergestellt, in denen das gesamte Reaktionsvolumen durch Aqua dest. ersetzt wurde.

Das SYBR Green-Reaktionsgemisch enthält den interkalierenden Farbstoff, die notwendigen Nukleotide sowie eine thermostabile DNA-Polymerase.

### 3.5 Datenerhebung und Interpretation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob das 16S rDNA-Gen als Referenzgen für Genexpressionsanalysen geeignet ist (siehe 1.8).

Hierfür wurden DNA und RNA aus Zellpopulationen isoliert und mittels qPCR, im Fall der RNA-Bestimmung nach zuvor durchgeführter reverser Transkription, auf ihre jeweiligen

## Methodik

Quantitäten hin untersucht. Um anhand der CP-Werte (siehe **3.4.5**) aus der real time-PCR Schlüsse auf die RNA oder DNA-Mengen ziehen zu können, mussten Standardkurven erstellt werden, die standardisierte Mengen des amplifizierten 16S-rDNA-Fragments auf bestimmte CP-Werte beziehen. Anschließend mussten die Mengen an RNA oder DNA in Kopienzahlen umgerechnet werden.

### **3.5.1 Erstellung der Standardkurve für 16S-rDNA-Mengen**

Für die Erstellung der Standardkurven sollte eine möglichst hohe Konzentration des 16S-rDNA-Fragments mittels qPCR amplifiziert werden.

Es wurde zunächst eine reguläre Isolation der gesamten DNA aus Zellpellets mit dem SurePrep-Isolationskit durchgeführt (siehe **3.4.3**). Anschließend wurde eine PCR durchgeführt (siehe **3.4.4**). Hierbei wurden 16S-rDNA-Primer verwendet (siehe **2.2, Tabelle 2**). Die Lösung wurde am Ende des Amplifikationsprozesses nach Gebrauchsanweisung mittels des „QIAquick PCR Purification Kit“ von verbleibenden „Primern“, Nukleotiden und Enzymen gereinigt und anschließend auf ihren DNA-Gehalt geprüft, um einen Ausgangswert der DNA-Menge zu erhalten, auf den die Standardkurve bezogen werden konnte.

Basierend auf dem oben beschriebenen Produkt der PCR wurde eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnungsstufe von  $1/10^{10}$  erstellt. Die Verdünnung wurde mit DNase-freiem Aqua dest. durchgeführt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden anschließend als DNA-Matrix in eine qPCR gegeben. Da die Ursprungskonzentration an 16S-rDNA bekannt war, konnte den ermittelten Cp-Werten in jeder Verdünnungsstufe eine entsprechende Konzentration an initialer DNA-Matrix zugeschrieben werden.

Um einen direkten Bezug zwischen dem Cp-Wert der qPCR und der Anzahl an generierten DNA-Kopien herstellen zu können, wurde die Masse der als Matrix verwendeten DNA mittels der molaren Masse des generierten 16S-rDNA-Genfragmentes mit einer Größe von 352 Basenpaaren in die absolute Kopienzahl in diesem Experiment umgerechnet.

Nukleotid	Molare Masse (g/mol)	Anzahl der Nukleotide im 16S-rDNA-Fragment	Gesamtmasse (g/mol)
dAMP	331,2213	80	26.497,70
dCMP	307,1966	111	34.098,82
dGMP	347,2207	68	23.611,01
dTMP	322,2079	93	29.965,33

Tabelle 16 Molare Masse der Nukleotide in der Sequenz zur Erstellung einer Standardkurve für 16S-rDNA-Mengenbestimmung

Ausgehend von der hier angegebenen Molmasse der einzelnen Nukleotide wurde die Molmasse des gesamten Fragmentes berechnet. Hierbei war zu bedenken, dass sich nach dem Abkühlen des Produktes Doppelstränge bilden würden. Somit musste für jede Base in der Sequenz die Molmasse der korrespondierenden Base hinzugerechnet werden. Für das gesamte doppelsträngige Fragment ergab sich eine Molmasse von 216.791,686 g/mol. Für die Berechnung der Kopienzahl wurde die Stoffmenge anschließend mit der Avogadro'schen Zahl ( $N_A = 6,0223 \cdot 10^{23}$ ) multipliziert.

### 3.5.2 Erstellung der Standardkurve für cDNA-Mengen

Da die in der qPCR eingesetzten Polymerasen keine RNA amplifizieren können, ist die qPCR nicht geeignet, um RNA direkt zu quantifizieren. Daher wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, bevor sie für die qPCR verwendet wurde. Die reverse Transkriptionsreaktion kann unterschiedlich effizient ablaufen, abhängig von der Konzentration der Zielnukleinsäure. Da spätere Messungen mittels qPCR eine Aussage über die Menge an ursprünglich vorhandener RNA und nicht an cDNA treffen sollten, musste sich die Standardkurve auf die vor der reversen Transkription gemessene Masse an RNA in den Isolaten beziehen. Dann kann die Umrechnung der cDNA-Menge zu korrespondierenden RNA-Menge umgangen werden, vorausgesetzt, dass die reverse Transkription immer gleichartig durchgeführt wurde und somit eine vergleichbare Effizienz aufweist.

Für die Erstellung der RNA-Standardkurve wurde DNA isoliert und das zu untersuchende 16S-rDNA-Fragment unter Nutzung der „Primer“ mit einer T7-Promoter-Extension in einer Taq-PCR vervielfältigt.

## Methodik

Anschließend wurde die so gewonnene DNA in RNA umgeschrieben. Hierfür wurde das MAXIscript RNA-Kit und eine T7-Polymerase sowie stets RNase-freie Reaktionsgefäße und RNase-freies Wasser verwendet. Nach der Umschreibung in RNA wurde DNase hinzugefügt und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert, um die ursprüngliche Ziel-DNA zu entfernen, damit das später mittels qPCR erzeugte DNA-Produkt die einzig messbare DNA im Reaktionsansatz blieb. Die Effektivität des DNase-Verdaus wurde einmalig per Gelelektrophorese geprüft.

Bevor die RNA wieder in cDNA umgeschrieben werden konnte, wurde die Konzentration der unverdünnten RNA-Lösung gemessen. Danach wurde eine Verdünnungsreihe analog zu der Verdünnungsreihe der DNA-Standardkurve erstellt. Die Verdünnungsstufen wurden einzeln als Matrizen jeweils zusammen mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit für die reverse Transkription verwendet.

Die Umrechnung der RNA-Masse in eine Kopienzahl wurde analog zur Berechnung der DNA-Standardkurve durchgeführt. Zu beachten war lediglich, dass die Molmassen die Werte von Ribonukleinsäuren statt der von Desoxyribonukleinsäuren eingesetzt wurden. Die Verwendung der T7-Primer führt zur Synthese von Fragmenten mit einer Größe von 555 Basenpaaren. Das eigentlich replizierte Fragment des bakteriellen Genoms ist 552 Basenpaare lang, jedoch werden 3 Basenpaare vom T7-Promoter der Primer mit transkribiert und verlängern somit das Fragment.

Die verwendeten Molmassen für die einzelnen Nukleotide und die daraus resultierenden Gesamtmassen in den replizierten 16S-rDNA-Fragmenten werden in **Tabelle 17** dargestellt.

Nukleotid	Molare (g/mol)	Masse	Anzahl der Nukleotide im 16S-rDNA-Fragment	Gesamtmasse (g/mol)
AMP	347,2	122		42.358,40
CMP	323,2	169		54.620,80
GMP	363,22	113		41.043,86
UMP	324,28	151		48.966,28

Tabelle 17 Molare Masse der Nukleotide in der Sequenz zur Erstellung einer Standardkurve für 16S-cDNA

### 3.5.3 Zusammenführung der Daten

Es wurden für beide zu untersuchenden Stämme Messkurven sowohl für die DNA- als auch für die RNA-Mengen erstellt. Hierfür wurden jeweils 2 biologische Replikate mit je drei technischen Replikaten gemessen. Es wurden zunächst die technischen Replikate eines biologischen Replikates gemittelt und anschließend der Mittelwert der biologischen Replikate gebildet. Ausreißer unter den Messwerten der technischen Replikate wurden mit einem Signifikanzniveau von  $P=0,05$  mittels des Dean-Dixon-Tests ermittelt.

Um eine lineare Formel für die Regressionsgerade erhalten zu können, mussten sowohl Cp-Werte als auch die korrespondierenden Konzentrationen der DNA-Lösung auf linearen Skalen aufgetragen werden. Da sich die Konzentration der DNA-Lösungen jedoch über mehrere Zehnerpotenzen bewegte, wurde die in eine Kopienzahl umgerechnete DNA-Mengen logarithmiert und auf einer linearen Skala aufgetragen.

Der Verlauf der Standardkurven ist nicht in allen Konzentrationsbereichen linear. Bei sehr großen und sehr kleinen Konzentrationen der initialen DNA-Matrix entfernte sich die Kurve von einem linearen Verlauf. Daher wurde der Gültigkeitsbereich für die Standardkurven auf den Bereich begrenzt, in dem der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden möglichst groß war. Dies bedeutete, dass bei der Erhebung der Messdaten aus den verschiedenen Bakterienkulturen darauf zu achten war, dass die Cp-Werte der qPCRs jeweils in den Gültigkeitsbereich der Standardkurven fielen.

Um dies zu erreichen, wurden die DNA-Lösungen 1/100 mit Aqua dest. verdünnt, während RNA-Isolate 1/10.000 verdünnt wurden, bevor sie in cDNA umgeschrieben wurden.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Induktion der zu untersuchenden Zustände in

#### ***Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus***

In einem ersten Schritt sollte die Effizienz einer VBNC-Induktion bei den zwei Staphylokokken-Stämmen durch verschiedene Inkubationsbedingungen getestet werden. Zur Bestimmung von Kultivierbarkeit und Membranintegrität der beiden Staphylokokken-Stämme wurden diese auf Festmedien ausplattiert sowie einer durchflusszytometrischen Messung unterworfen. Eine besonders hohe VBNC-Induktionseffizienz lag vor, wenn eine möglichst geringe Zahl an kultivierbaren Zellen in Kombination mit einem hohen Anteil an Zellen mit erhaltener Zellmembran erreicht wurde.

Im Folgenden werden die Lebendkeimzahlen mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Membranintegrität der Zellen in den entsprechenden Suspensionen verglichen. Für alle Zustände wurden drei biologische Replikate auf diese Merkmale hin untersucht. Nachfolgend werden für *Staphylococcus epidermidis* und für *Staphylococcus aureus* jeweils die Ergebnisse aller Replikate zusammengefasst dargestellt. Die hier dargestellten Abbildungen der durchflusszytometrischen Messungen sind repräsentativ für die Messungen aller biologischen Replikate beider untersuchten Bakterienstämme.

#### **4.1.1 Lebendkeimzahl und Viabilität nach VBNC-Induktion**

Die Lebendkeimzahl wurde für jedes Replikat direkt nach der Überführung in das Induktionsmedium und nach 24-stündiger Inkubation im Induktionsmedium bei 37 °C ermittelt. Die Differenz beider Werte ist durch den Übergang einiger Bakterienzellen in den VBNC-Zustand erklärt.

In **Tabelle 18** sind die Lebendkeimzahlen direkt nach Überführung in das Induktionsmedium dargestellt. **Tabelle 19** zeigt eine geringere Lebendkeimzahl beider Stämme nach 24-stündiger Inkubation im Induktionsmedium. Es handelt sich für jedes Replikat um das geometrische Mittel der drei höchsten Verdünnungsstufen, für welche Wachstum festgestellt werden konnte.

## Ergebnisse

Bezeichnung des biologischen Replikates	Lebendkeimzahl unmittelbar vor VBNC-Induktion (/ml)
<i>S.epidermidis</i> VBNC 1	3,67E+06
<i>S.epidermidis</i> VBNC 2	3,03E+06
<i>S.epidermidis</i> VBNC 3	4,64E+06
<i>S.aureus</i> VBNC 1	4,21E+06
<i>S.aureus</i> VBNC 2	3,02E+06
<i>S.aureus</i> VBNC 3	2,55E+06

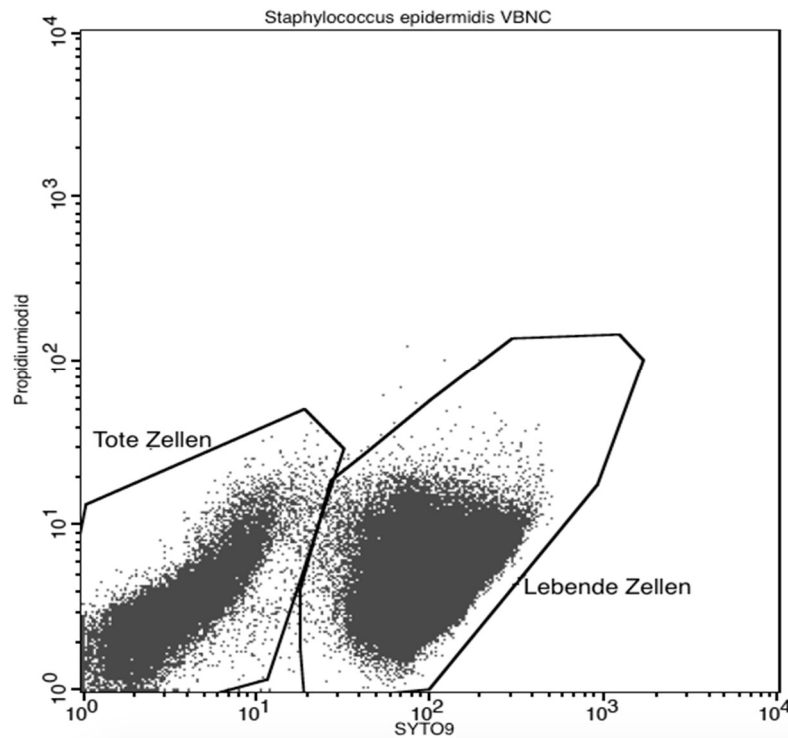
**Tabelle 18 Lebendkeimzahl direkt nach Überführung in das VBNC-Induktionsmedium, sprich vor einer weiteren Inkubation in dem entsprechenden Medium.** Die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten je Bakterienstamm sind dargestellt.

Bezeichnung des biologischen Replikates	Lebendkeimzahl nach 24-stündiger VBNC-Induktion (/ml)
<i>S.epidermidis</i> VBNC 1	0,00E+00
<i>S.epidermidis</i> VBNC 2	5,18E+04
<i>S.epidermidis</i> VBNC 3	2,58E+04
<i>S.aureus</i> VBNC 1	1,04E+04
<i>S.aureus</i> VBNC 2	3,15E+03
<i>S.aureus</i> VBNC 3	1,40E+03

**Tabelle 19 Lebendkeimzahl nach 24-stündiger Inkubation in VBNC-Induktionsmedium** Die Ergebnisse von drei biologischen Replikaten je Bakterienstamm sind dargestellt.

In der Durchflusszytometrie zeigten sich die Zellpopulationen größtenteils in dem für lebende Zellen typischen Fluoreszenzbereich (**Abbildung 11**).

## Ergebnisse



**Abbildung 11** Gegenüberstellung von roter und grüner Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie einer *Staphylococcus epidermidis*-Kultur nach 24-stündiger VBNC-Induktion. Aufgrund der Dichte der Punkte entsteht der Eindruck die Verteilung der Ereignisse auf die beiden Bereiche wäre annähernd gleich. Tatsächlich befinden sich über 90 % der registrierten Zellen im Fluoreszenzbereich für lebende Zellen.

Bei der Definition der Region R1, die als „Gate“ für die Fluoreszenzmessung genutzt werden sollte, zeigte sich, dass die Zellen in Volumen und Granularität nicht mehr von anderen Messereignissen abgrenzbar waren (**Abbildung 12**). Es wurde daher die Definition des „Gates“ aus Messungen planktonisch gewachsener Zellen übernommen (siehe 4.1.2.2, **Abbildung 15**).

## Ergebnisse

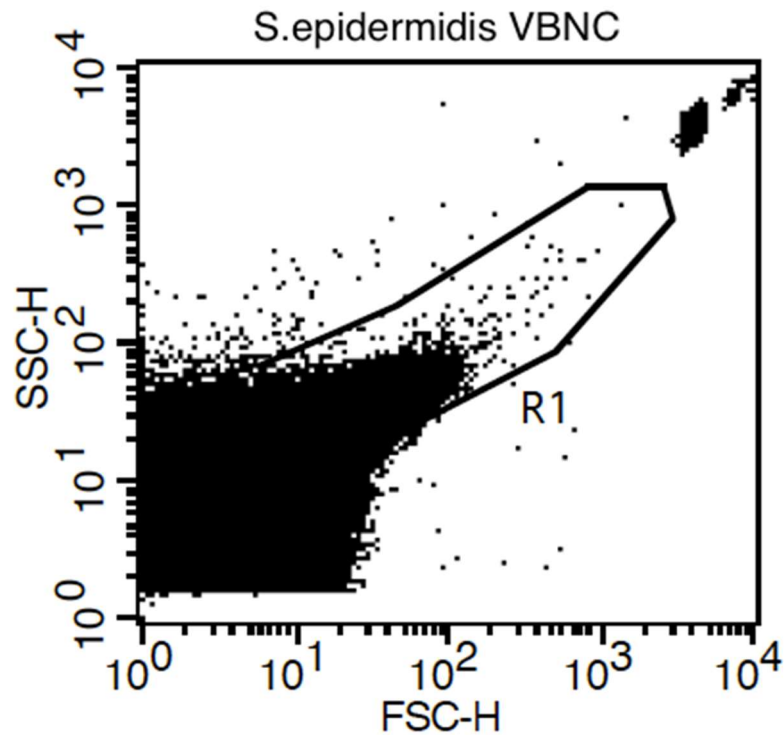


Abbildung 12 Gegenüberstellung von mittels Durchflusszytometrie gemessenem „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ einer *Staphylococcus epidermidis*-Kultur nach 24-stündiger Inkubation in VBNC-Induktionsmedium. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Region 1 eingegrenzt. Es wird deutlich, dass die Zellen nach VBNC-Induktion anhand ihrer Granularität und ihrem Volumen schlecht von anderen „Events“ in der Durchflusszytometrie abgrenzbar sind. Aufgrund der schlechten Abgrenzbarkeit zu anderen korpuskulären Anteilen der Suspension wurde der Bereich R1 aus Messungen planktonisch gewachsener Kulturen übernommen. In der oberen rechten Ecke ist die Punktwolke der „Counting Beads“ erkennbar.

Die zusammengefassten Ergebnisse der Durchflusszytometrie bezüglich der absoluten Zellzahl sind in Tabelle 20 dargestellt.

## Ergebnisse

Bezeichnung des biologischen Replikates	Gesamtzellzahl (/ml)	Zahl lebender Zellen (/ml)	Anteil lebender Zellen (% Gesamtzellzahl)
<i>S.epidermidis</i> VBNC 1	1,41E+08	1,18E+08	83,75
<i>S.epidermidis</i> VBNC 2	1,10E+07	9,47E+06	83,21
<i>S.epidermidis</i> VBNC 3	2,25E+07	2,06E+07	91,77
<i>S.aureus</i> VBNC 1	9,82E+06	9,44E+06	96,12
<i>S.aureus</i> VBNC 2	8,05E+07	7,87E+07	97,87
<i>S.aureus</i> VBNC 3	1,22E+07	1,15E+07	94,00

**Tabelle 20 Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 24-stündiger VBNC-Induktion.** Die Ergebnisse von jeweils drei biologischen Replikaten sind dargestellt.

Bei Betrachtung der Lebendkeimzahl nach Plattierung auf Festmedien im Verhältnis zu den in der Durchflusszytometrie als lebend definierten Zellen zeigte sich ein Anteil kultivierbarer Zellen von unter 1 % für alle biologischen Replikate (**Tabelle 21**)

Bezeichnung des biologischen Replikates	Anteil kultivierbarer Zellen an der Gesamtzellzahl lebender Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> VBNC 1	0,000
<i>S.epidermidis</i> VBNC 2	0,547
<i>S.epidermidis</i> VBNC 3	0,127
<i>S.aureus</i> VBNC 1	0,110
<i>S.aureus</i> VBNC 2	0,004
<i>S.aureus</i> VBNC 3	0,012

**Tabelle 21 Anteil kultivierbarer Zellen an der Population viabler Zellen der biologischen Replikate nach 24-stündiger VBNC-Induktion.** Die Ergebnisse von jeweils drei biologischen Replikaten sind dargestellt.

Es liegt nahe, dass Zellen, welche keine intakte Zellmembran aufwiesen, nicht weiter lebensfähig sind. Somit ergab sich der in **Tabelle 22** dargestellte Anteil an Zellen im VBNC-Zustand.

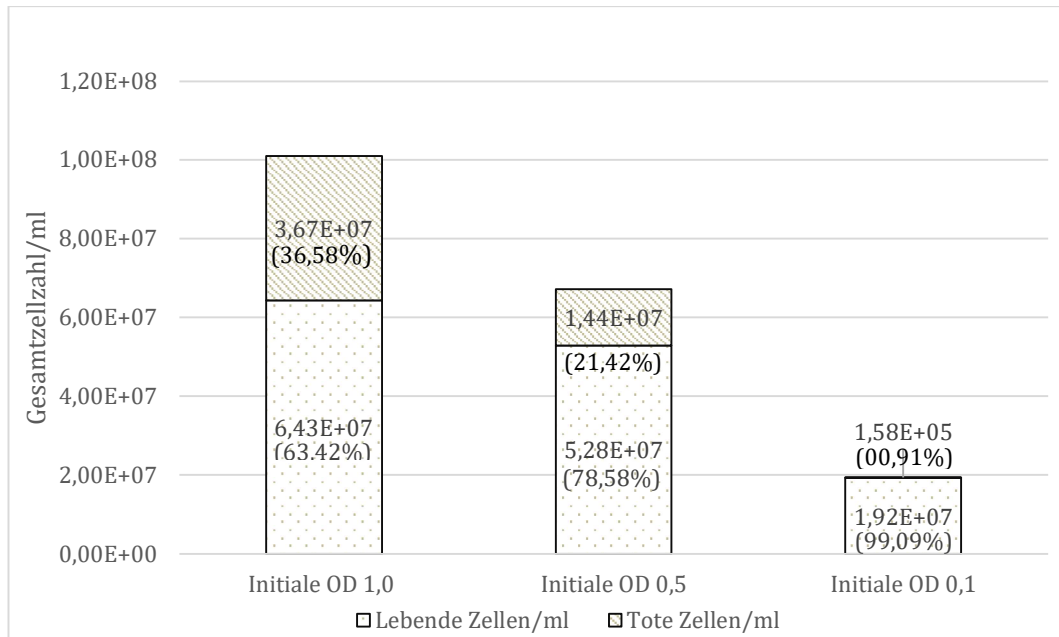
Bezeichnung des biologischen Replikates	Anteil VBNC-Zellen an der Gesamtzahl lebender Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> VBNC 1	83,75
<i>S.epidermidis</i> VBNC 2	82,75
<i>S.epidermidis</i> VBNC 3	91,65
<i>S.aureus</i> VBNC 1	96,01
<i>S.aureus</i> VBNC 2	97,87
<i>S.aureus</i> VBNC 3	93,99

Tabelle 22 Anteil der Zellen im VBNC-Zustand an der Gesamtpopulation nach 24-stündiger VBNC-Induktion. Die Ergebnisse von jeweils drei biologischen Replikaten sind dargestellt.

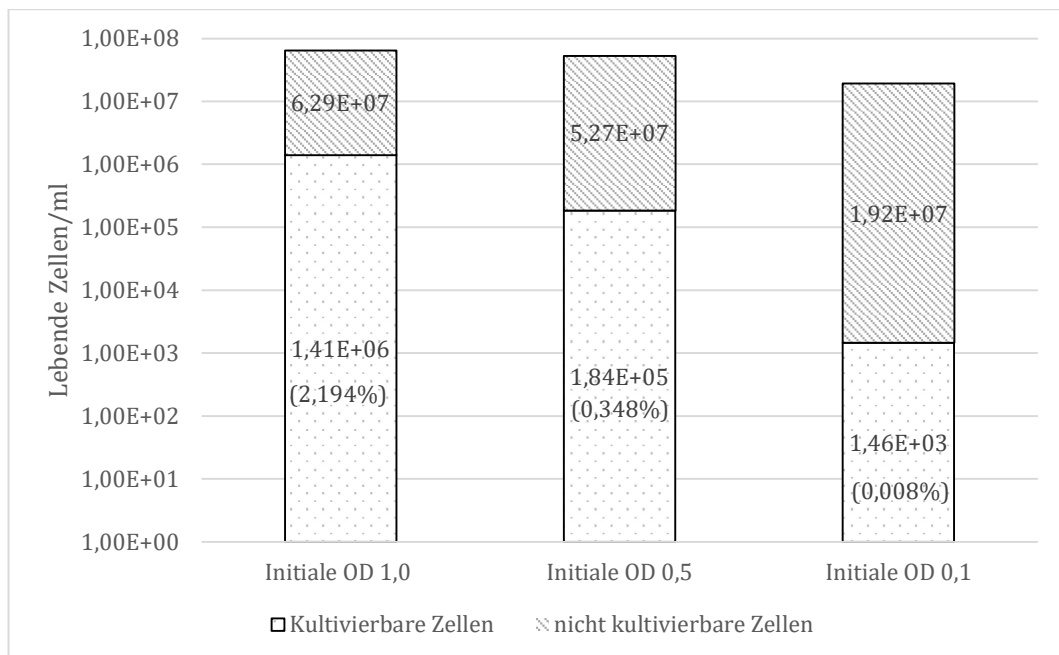
#### 4.1.2 Einfluss der initialen Zelldichte auf die VBNC-Induktion von *Staphylococcus epidermidis*

Nach Inkubation von unterschiedlichen Zellmengen von *Staphylococcus epidermidis* in VBNC-Induktionsmedium (gemessen durch die unterschiedliche optische Dichte) zeigte sich eine Abhängigkeit des Anteils von nach 24 Stunden noch lebenden Zellen (d.h. mit intakter Zellmembran) an der Gesamtpopulation von der initialen Zelldichte. Eine höhere initiale Zelldichte ging hierbei sowohl mit einem höheren Anteil toter Zellen (**Abbildung 13**), als auch einem geringeren Anteil nicht kultivierbarer lebender Zellen (**Abbildung 14**) einher. Diese Ergebnisse wurden nur für den *Staphylococcus epidermidis* Stamm, nicht aber für den *Staphylococcus aureus* gefunden. Um einen möglichst hohen Anteil lebender Zellen zu erreichen, wurden VBNC-Induktionskulturen daher - unabhängig vom zu untersuchenden Stamm - immer auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 13** Der Anteil toter Zellen einer *Staphylococcus epidermidis*-VBNC-Kultur in Abhängigkeit von der initialen optischen Dichte (OD) im Induktionsmedium. Gezeigt wird die Menge an Zellen, die nach 24-stündiger Inkubation unterschiedlich dicht mit *Staphylococcus epidermidis* beimpfter Kulturen im VBNC-Induktionsmedium mittels Durchflusszytometrie als tot oder als lebend klassifiziert wurden. Der Anteil toter Zellen in der Gesamtpopulation fiel umso größer aus, je höher die initiale Zelldichte im jeweiligen Kulturansatz (gemessen anhand der optischen Dichte) war.



**Abbildung 14** Kultivierbarkeit lebender *Staphylococcus epidermidis* Zellen nach 24-stündiger VBNC-Induktion in Abhängigkeit von der initialen optischen Dichte (OD) im Induktionsmedium, bestimmt anhand der Anzahl teilungsfähiger Zellen in Folgekulturen auf Blutagarplatten. Der Anteil kultivierbarer Zellen an der Gesamtheit lebender Zellen fiel niedriger aus, je geringer die initiale Zellmenge – gemessen anhand der optischen Dichte – im Induktionsmedium war.

### 4.1.3 Lebendkeimzahl und Viabilität planktonisch gewachsener Kulturen

In Wachstumsversuchen ergaben sich für 24 Stunden in BHI-Bouillon planktonisch gewachsene Bakterien höhere Lebendkeimzahlen als bei Ausplattierung von Kulturen nach VBNC-Induktion (**Tabelle 23**).

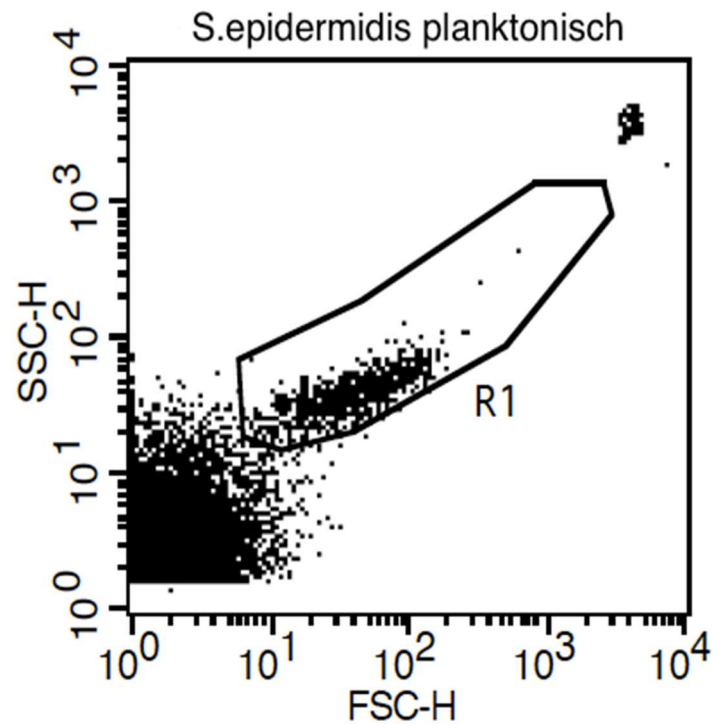
Bezeichnung des biologischen Replikates	Lebendkeimzahl (/ml)
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 1	4,68E+08
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 2	4,92E+08
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 3	2,03E+08
<i>S.aureus</i> Plankt. 1	3,70E+08
<i>S.aureus</i> Plankt. 2	2,80E+08
<i>S.aureus</i> Plankt. 3	3,45E+08

**Tabelle 23** Lebendkeimzahlen aller biologischen Replikate planktonisch gewachsener Zellen nach 24-stündiger Kultivierung in BHI-Flüssigmedium.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass der Großteil der Zellen als lebend klassifiziert werden konnte. In der Analyse von „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ Werten gelang die Abgrenzung der planktonisch gewachsenen Zellen gegen andere Bestandteile des Mediums (**Abbildung 15**) besser als aus den Proben nach VBNC-Induktion oder Biofilmbildung (**Abbildung 12**, **Abbildung 16**).



## Ergebnisse



**Abbildung 15** Die Betrachtung von mittels Durchflusszytometrie gemessenen Side Scatter und Forward Scatter Werten einer planktonisch gewachsenen *Staphylococcus epidermidis*-Kultur. Die Zellen lassen sich gut als Punktwolke von den restlichen korpuskulären Anteilen des Mediums unterscheiden. (Vergleiche **Abbildung 12**, Werte desselben Stamms nach VBNC-Induktion)

In **Tabelle 24** sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bezüglich absoluter Zellzahl für *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* zusammengefasst.

## Ergebnisse

Bezeichnung Bakterienstammes	des Zellen (/ml)	Lebende Zellen (/ml)	Lebende Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 1	3,13E+09	2,57E+09	82,06
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 2	1,51E+09	1,22E+09	81,86
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 3	8,79E+08	8,52E+08	96,93
<i>S.aureus</i> Plankt. 1	5,81E+08	5,12E+08	88,26
<i>S.aureus</i> Plankt. 2	3,09E+08	3,03E+08	97,89
<i>S.aureus</i> Plankt. 3	3,04E+08	2,99E+08	98,23

**Tabelle 24** Ergebnisse der Durchflusszytometrischen Untersuchung von *Staphylococcus epidermidis*- / *Staphylococcus aureus*- Zellen nach 24 h planktonischem Wachstum in BHI-Flüssigmedium. Es wird sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die absolute Zahl an lebenden Zellen (sprich mit intakter Zellmembran) und der prozentuale Anteil dieser an der Gesamtpopulation aufgeführt.

In sämtlichen Replikaten fand sich ein Anteil nicht kultivierbarer Zellen. Dieser war auch bei gleichen Kultivierungsbedingungen mehrerer Replikate unterschiedlich stark ausgeprägt und reichte von 8 % bis 81 %. In **Tabelle 25** sind die Anteile kultivierbarer Zellen der Replikate dargestellt.

Bezeichnung des biologischen Replikates	Anteil kultivierbarer Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 1	18,210
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 2	18,416
<i>S.epidermidis</i> Plankt. 3	89,202
<i>S.aureus</i> Plankt. 1	72,266
<i>S.aureus</i> Plankt. 2	92,409
<i>S.aureus</i> Plankt. 3	66,555

**Tabelle 25** Anteil kultivierbarer *Staphylococcus epidermidis*- / *Staphylococcus aureus*-Zellen aller biologischen Replikate nach 24 h planktonischem Wachstum in BHI-Flüssigmedium.

### 4.1.4 Lebendkeimzahl und Viabilität von in Biofilmen gewachsenen Kulturen

Nach Behandlung der Biofilm-Suspension im Ultraschallbad (Siehe 3.2.3.3) und Ausplattierung auf Nähragar zeigte sich eine hohe Zahl koloniebildender Einheiten, ähnlich den planktonisch gewachsenen Kulturen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 26** dargestellt.

## Ergebnisse

Bezeichnung des biologischen Replikates	Lebendkeimzahl (/ml)
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 1	9,10E+07
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 2	5,24E+09
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 3	2,09E+08
<i>S.aureus</i> Biofilm 1	1,31E+09
<i>S.aureus</i> Biofilm 2	2,52E+09
<i>S.aureus</i> Biofilm 3	8,76E+08

**Tabelle 26 Lebendkeimzahlen von aus Biofilmen suspendierten Zellen.** Es sind die Ergebnisse sämtlicher biologischen Replikate beider untersuchten Bakterienstämme dargestellt.

In der Durchflusszytometrie der aus der Biofilmmatrix gelösten Bakterien zeigten sich überwiegend lebende Zellen.

Ähnlich den Zellen, die einer VBNC-Induktion unterzogen wurden, war in der Betrachtung der Messwerte von „Side Scatter“ gegen „Forward Scatter“ die Punktwolke, welche bei planktonisch gewachsenen Bakterien zu sehen war, nicht klar abzugrenzen. Bei Reduktion des Anteils dargestellter Ereignisse ließ sich jedoch eine höhere Ereignisdichte im Bereich der erwarteten Punktwolke erkennen (**Abbildung 16**). R1 wurde daher nicht angepasst und wurde von der Messung planktonisch gewachsener Zellen übernommen.

## Ergebnisse

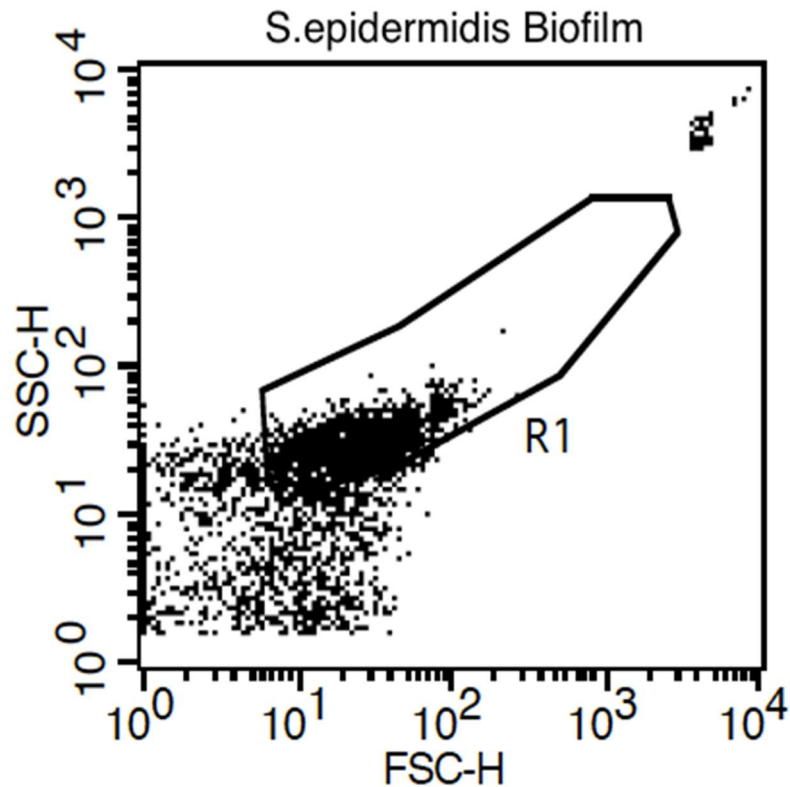


Abbildung 16 Betrachtung der durch Durchflusszytometrie ermittelten Werte von „Side Scatter“ und „Forward Scatter“ einer als Biofilm gewachsenen *Staphylococcus epidermidis*-Kultur. Bei reduzierter Darstellung der Ereignispunkte zeigt sich eine höhere Ereignisdichte für die Bakterienzellen im erwarteten Bereich R1. Die Verteilung weiterer korpuskulärer Bestandteile des Mediums überschneidet sich stark mit R1.

In **Tabelle 27** sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für alle biologischen Replikate nach Biofilmwachstum zusammengefasst dargestellt.

Bezeichnung des Replikates	biologischen Zellen (/ml)	Lebende Zellen (/ml)	Lebende Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 1	5,20E+09	5,10E+09	98,95
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 2	1,90E+09	1,70E+09	90,93
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 3	6,50E+08	6,38E+08	97,31
<i>S.aureus</i> Biofilm 1	2,97E+09	2,79E+09	93,95
<i>S.aureus</i> Biofilm 2	8,64E+08	8,07E+08	93,38
<i>S.aureus</i> Biofilm 3	5,27E+09	5,11E+09	96,95

Tabelle 27 Ergebnisse der Durchflusszytometrischen Untersuchung *Staphylococcus epidermidis*- / *Staphylococcus aureus*- Zellen aller biologischen Replikate aus Biofilmverbünden.

## Ergebnisse

Der Anteil kultivierbarer Zellen aus der ultraschallbehandelten Suspension des Biofilmmaterials an der Gesamtzahl lebender Zellen in der Durchflusszytometrie war wie in **Tabelle 28** dargestellt.

Bezeichnung des biologischen Replikates	Anteil kultivierbarer Zellen (%)
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 1	17,843
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 2	21,150
<i>S.epidermidis</i> Biofilm 3	32,759
<i>S.aureus</i> Biofilm 1	46,953
<i>S.aureus</i> Biofilm 2	31,227
<i>S.aureus</i> Biofilm 3	17,149

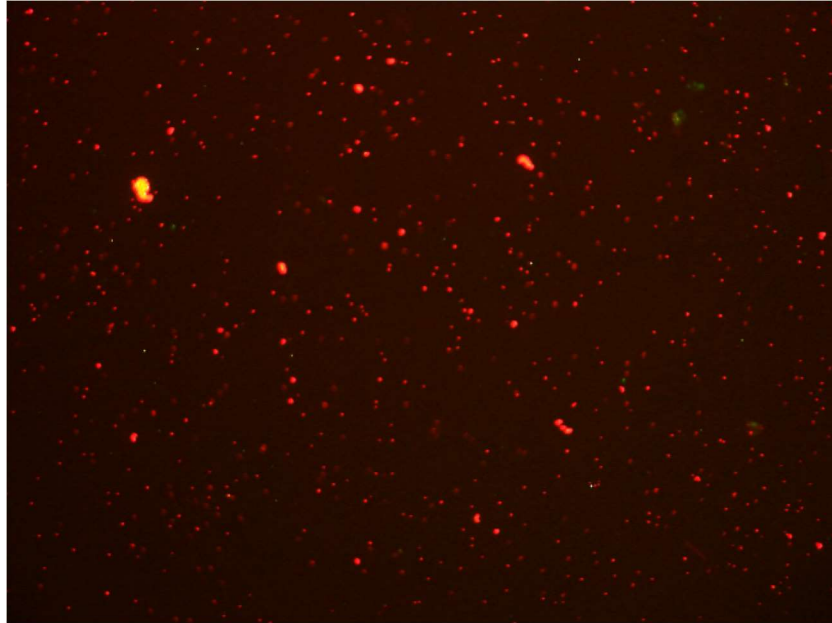
Tabelle 28 Kultivierbare *Staphylococcus epidermidis*- / *Staphylococcus aureus*-Zellen aller biologischen Replikate aus Biofilmverbünden

### 4.1.5 Lebendkeimzahl und Viabilität thermisch abgetöteter Bakterien

Nachdem die Übernachtskulturen thermisch abgetötet und unverdünnt ausplattiert wurden, hatten sich nach 24-stündiger Inkubation keine Kolonien auf den Agarplatten gebildet. Die Lebendkeimzahl wurde für sämtliche biologischen Replikate als 0 vermerkt.

In der Fluoreszenzmikroskopie wurden Zellen mit erhaltener Membranintegrität nur in sehr geringen Anteilen festgestellt (**Abbildung 17**). Es wurden je biologischem Replikat drei Gesichtsfelder untersucht.

## Ergebnisse

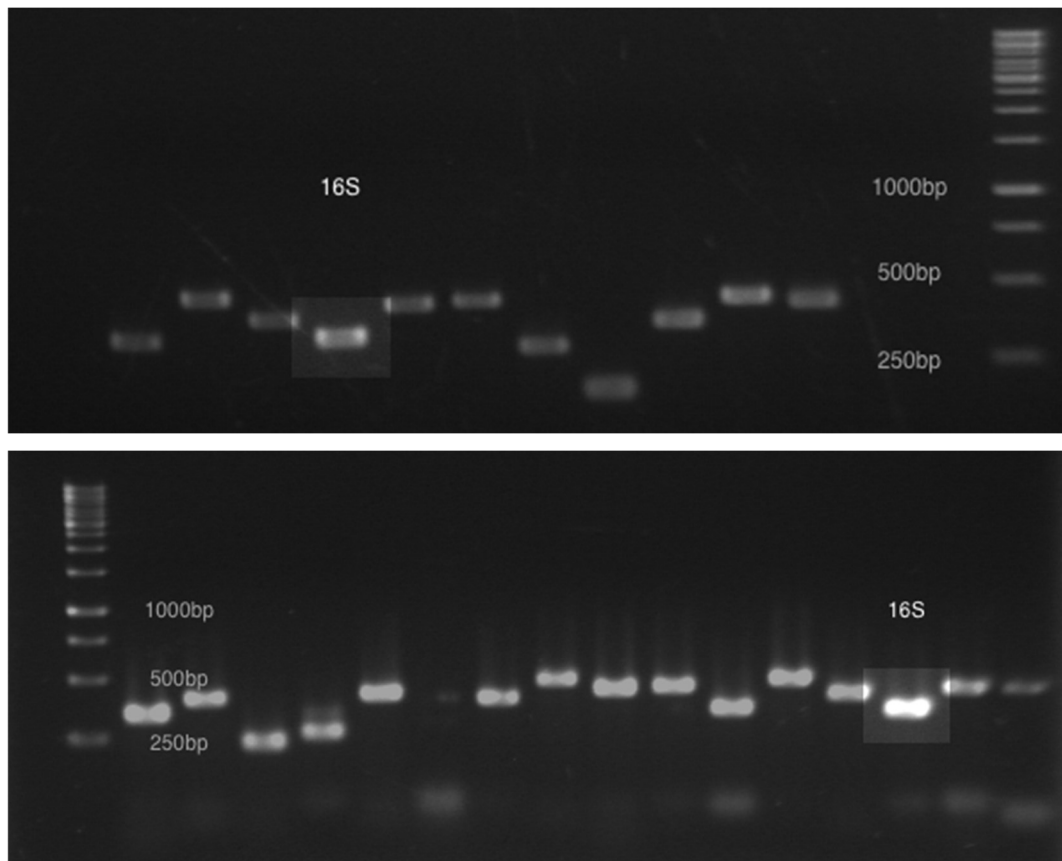


**Abbildung 17** Repräsentatives Gesichtsfeld der Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation von *Staphylococcus aureus* bei 80°C. Die rote Fluoreszenz signalisiert, dass nahezu alle Zellen ihre Membranintegrität verloren haben und als tot eingestuft werden konnten. Diese Abbildung ist repräsentativ für den Befund aller biologischen Replikate beider untersuchten Stämme.

### 4.2 Überprüfung der „Primer“ und des DNase-Verdaus

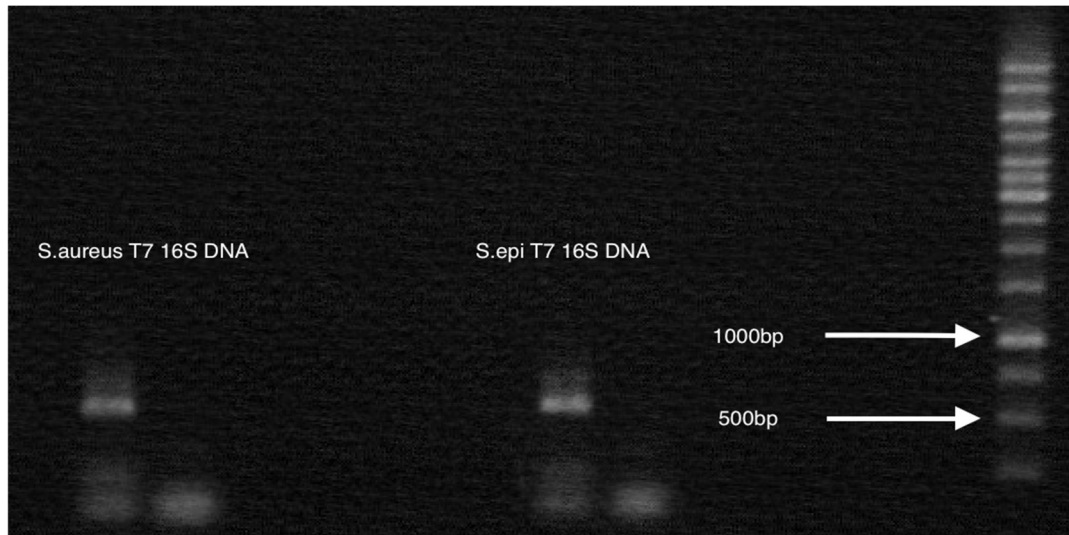
Vor der Erstellung von Standardkurven war es notwendig zu prüfen, ob die in der PCR verwendeten „Primer“ ausschließlich zur Synthese von Fragmenten in der beabsichtigten Größe führen. Es wurden Taq-PCRs jeweils mit aus *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* isolierter DNA durchgeführt (**Abbildung 18**). Hierdurch konnte die korrekte Größe der resultierenden Fragmente verifiziert werden. Außerdem musste die korrekte Größe der Fragmente aus der T7-RNA-Transkription vom PCR-generierten Produkt sichergestellt werden. Hierfür wurden qPCRS mit RNA Präparationen aus *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* nach Transkription in cDNA mit und ohne nachfolgendem DNase-Verdau durchgeführt. Somit konnte sowohl die Effektivität des DNase-Verdaus, als auch die korrekte Fragmentgröße bei Verwendung des T7-Primerpaares in Kombination mit der genomischen DNA aus beiden untersuchten Stämmen geprüft werden (**Abbildung 19**).

## Ergebnisse



**Abbildung 18 Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die mit regulären 16S-rDNA-„Primern“ generiert wurden.** Im Rahmen einer Prüfung mehrerer Primerpaare wurde die korrekte Größe der mit den 16S-„Primern“ generierten PCR-Produkte getestet. Die Größe von 352 Basenpaaren (bp) wurde bestätigt (in der Abbildung durch aufgehellten Bereich hervorgehoben). Im oberen Teil der Abbildung ist das Ergebnis einer PCR mit der aus *Staphylococcus aureus* isolierten DNA, im unteren Teil der Abbildung mit DNA aus *Staphylococcus epidermidis* dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 19** Gelelektrophorese von PCR- und T7-Polymerase-Transkriptions- Produkten unter Verwendung von genomischer DNA aus *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*. Neben den Banden für das jeweilige Produkt der T7-Transkription im Bereich unterhalb der 500 bp Referenzbande sind jeweils eine weitere Bande entsprechend des Produktes einer regulären Taq-PCR in der Höhe der 500 bp Referenzbande erkennbar. Die errechnete Fragmentgröße von 552 Basenpaaren konnte bestätigt werden. Das Fehlen der gleichen Bande nach DNase-Verdau bestätigt deren biochemische Identität im Sinne einer doppelsträngigen DNA.

### 4.3 Erstellung von Standardkurven

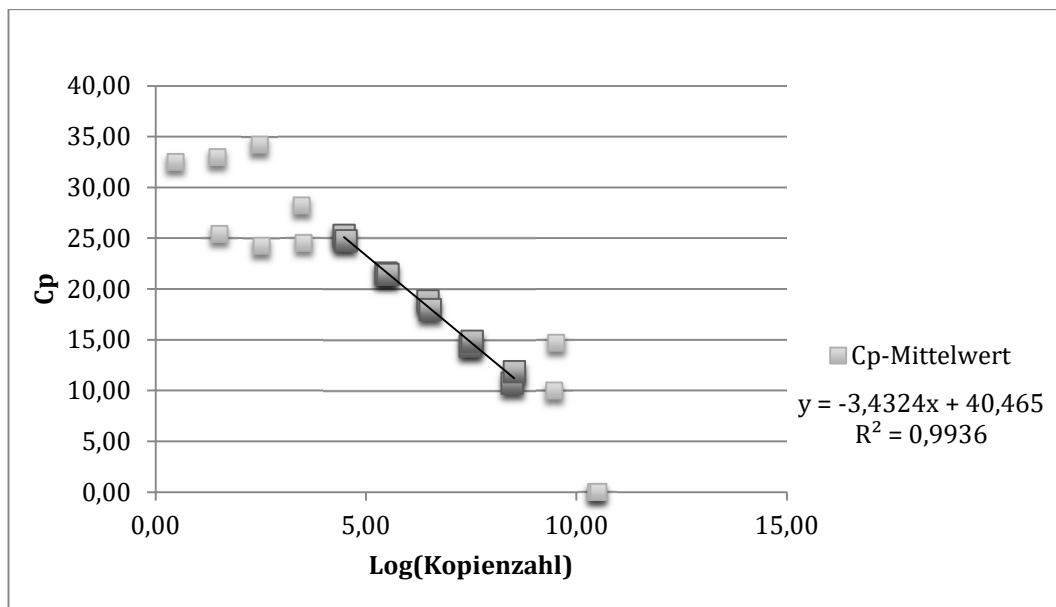
Um Cp-Werte einer qPCR auf eine bestimmte Menge an rRNA oder rDNA beziehen zu können, wurden qPCRs mit Verdünnungsreihen bekannter Mengen DNA zu je drei technischen Replikaten durchgeführt (siehe 3.5.1 und 3.5.2). Für beide zu untersuchenden Stämme wurden je zwei Eichmessungen für cDNA und für genomische DNA (gDNA) durchgeführt. Hier werden in Kopienzahlen umgerechnete, vorher bestimmte Mengen an cDNA/gDNA mit den Mittelwerten der in der qPCR resultierenden Cp-Werten der technischen Replikate in Relation gesetzt. Anschließend sind die Diagramme mit den dazugehörigen Regressionsgeraden dargestellt. Hier wurden auch jene Datenpunkte dargestellt, die nicht in die Berechnung der Regressionsgeraden eingeflossen sind (erkennbar an der Begrenzung der jeweiligen Gerade). Dies soll verdeutlichen, dass es für die Messung des RNA/DNA Verhältnisses wichtig war, die RNA bzw. DNA auf ein Maß zu verdünnen, in dem zu erwarten war, dass Cp-Werte in der qPCR entstehen, die eine lineare Korrelation zu den tatsächlichen Kopienzahlen aufweisen. Die für die Berechnung der Regressionsgerade relevanten Werte wurden fett hervorgehoben. Anschließend werden die Datenpunkte graphisch mitsamt der Regressionsgeraden dargestellt.



## Ergebnisse

### 4.3.1 Standardkurve für eine quantitative 16S-rDNA PCR mit genomischer *Staphylococcus aureus* DNA-Matrize

In **Abbildung 20** sind die Ergebnisse der qPCR, sprich die Cp-Werte, für zwei *Staphylococcus aureus* gDNA-Verdünnungsreihen (unverdünnte gDNA-Konzentration: 142,78 ng/μl und 159,52 ng/μl) gegen die entsprechende Genomkopienzahl aufgetragen. Es werden alle Messpunkte dargestellt, jedoch diejenigen Punkte hervorgehoben, welche im linearen Messbereich liegen und daher in die Berechnung der Regressionsgeraden einfließen. Zusätzlich ist die Formel der Regressionsgeraden in der Abbildung angegeben, mit welcher in weiteren Messungen von einem Cp-Wert auf eine bestimmte Genomkopienzahl geschlossen werden konnte.

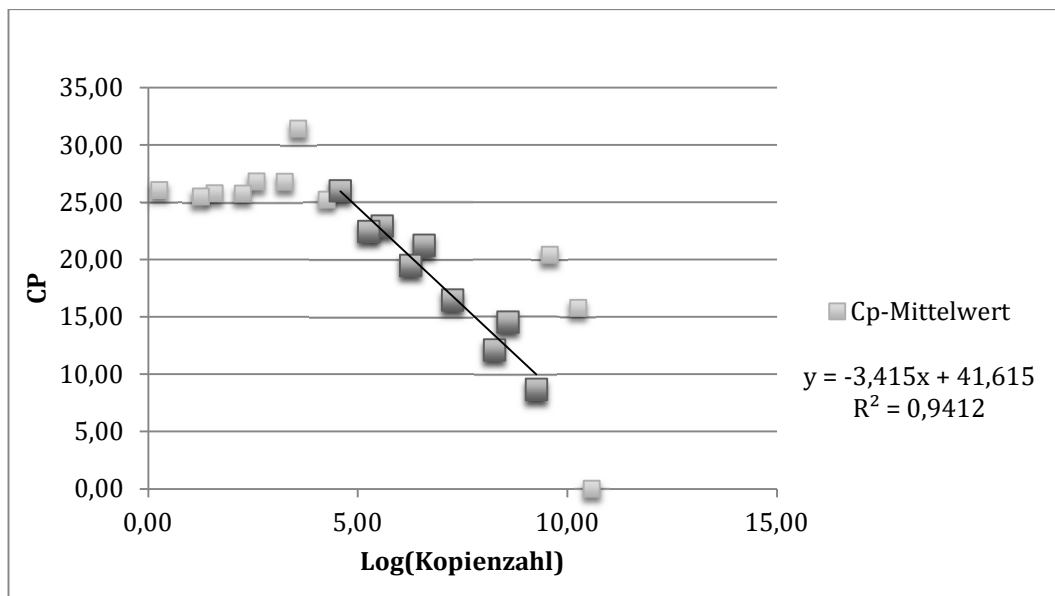


**Abbildung 20** Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rDNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden genomischen *Staphylococcus aureus* DNA (gDNA). Dargestellt sind die Cp-Werte aus der qPCR gegen den dekadischen Logarithmus der errechneten Genomkopienzahl für *Staphylococcus aureus*. Der Bereich der linearen Korrelation lag zwischen Log(Kopienzahl)=5 und Log(Kopienzahl)=8,5 (fett gedruckt). Jeder Cp-Wert stellt den Mittelwert dreier technischer Replikate dar.

Gemäß dieser Standardkurve mussten gDNA-Proben verdünnt werden, damit diese in einer 16S-rDNA-PCR zu Cp-Werten im Bereich zwischen 10 und 25 führten.

#### 4.3.2 Standardkurve für eine quantitative 16S-rDNA PCR mit genomischer *Staphylococcus epidermidis* DNA-Matrize

In **Abbildung 21** sind die Ergebnisse der qPCR, sprich die Cp-Werte, für zwei *Staphylococcus epidermidis* gDNA-Verdünnungsreihen (unverdünnte gDNA-Konzentration: 87,78 ng/μl und 184,36 ng/μl) gegen die entsprechende Genomkopienzahl aufgetragen. Es werden alle Messpunkte dargestellt, jedoch diejenigen Punkte hervorgehoben, welche im linearen Messbereich liegen und daher in die Berechnung der Regressionsgeraden einfließen. Zusätzlich ist die Formel der Regressionsgeraden in der Abbildung angegeben, mit welcher in weiteren Messungen von einem Cp-Wert auf eine bestimmte Genomkopienzahl geschlossen werden konnte.

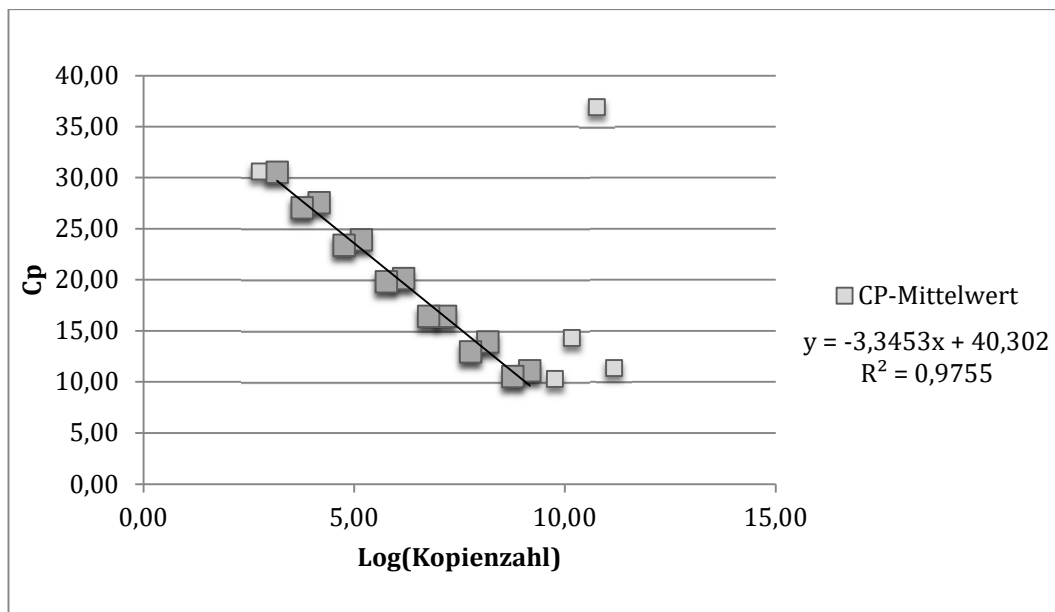


**Abbildung 21** Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rDNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden genomischen *Staphylococcus epidermidis* DNA (gDNA). **Dargestellt sind die Cp-Werte aus der qPCR gegen den dekadischen Logarithmus der errechneten Genomkopienzahl für *Staphylococcus epidermidis*. Der Bereich der linearen Korrelation lag zwischen Log(Kopienzahl)=5 und Log(Kopienzahl)=10 (fett gedruckt). Jeder Cp-Wert stellt den Mittelwert dreier technischer Replikate dar.**

Gemäß dieser Standardkurve mussten gDNA-Proben verdünnt werden, damit diese in einer 16S-rDNA-PCR zu Cp-Werten im Bereich zwischen 10 und 26 führten.

#### 4.3.3 Standardkurve für eine quantitative 16S-rRNA PCR mit komplementärer *Staphylococcus aureus* DNA-Matrize

In **Abbildung 22** sind die Ergebnisse der qPCR, sprich die Cp-Werte, für zwei *Staphylococcus aureus* cDNA-Verdünnungsreihen (unverdünnte cDNA-Konzentration: 23,89 ng/μl und 60,67 ng/μl) gegen die entsprechende Genomkopienzahl aufgetragen. Es werden alle Messpunkte dargestellt, jedoch diejenigen Punkte hervorgehoben, welche im linearen Messbereich liegen und daher in die Berechnung der Regressionsgeraden einfließen. Zusätzlich ist die Formel der Regressionsgeraden in der Abbildung angegeben, mit welcher in weiteren Messungen von einem Cp-Wert auf eine bestimmte RNA-Kopienzahl geschlossen werden konnte.

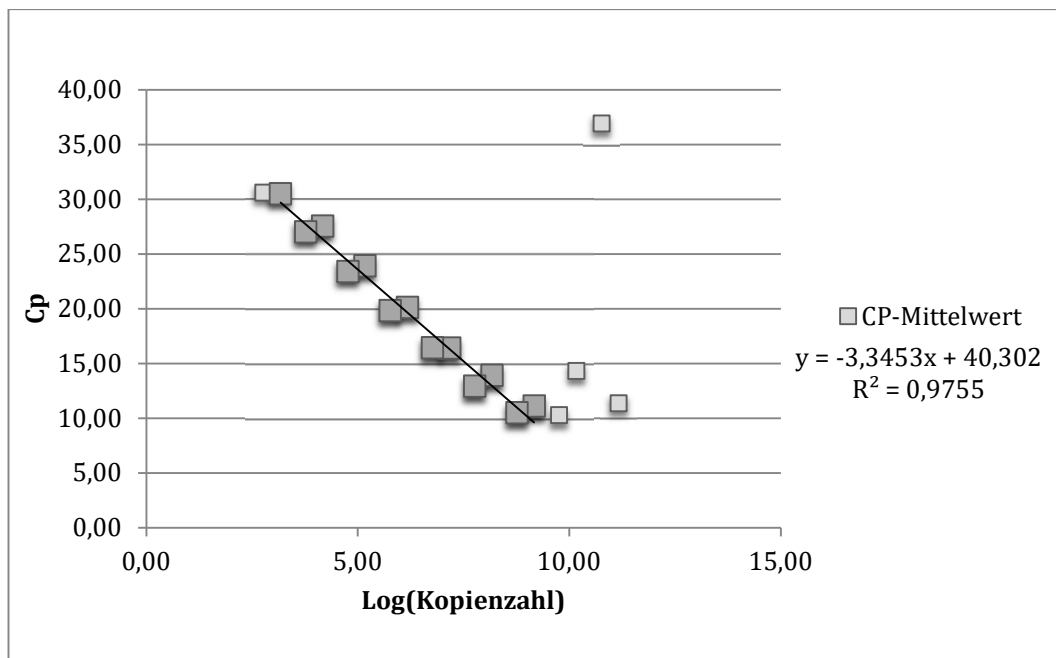


**Abbildung 22** Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rRNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden komplementären *Staphylococcus aureus* DNA (cDNA). Dargestellt sind die Cp-Werte aus der qPCR gegen den dekadischen Logarithmus der errechneten Genomkopienzahl für *Staphylococcus aureus*. Der Bereich der linearen Korrelation lag zwischen Log(Kopienzahl)=3,6 und Log(Kopienzahl)=9,1 (fett gedruckt). Jeder Cp-Wert stellt den Mittelwert dreier technischer Replikate dar.

Gemäß dieser Standardkurve mussten cDNA-Proben verdünnt werden, damit diese in einer 16S-rRNA-PCR zu Cp-Werten im Bereich zwischen 10 und 30 führten.

#### 4.3.4 Standardkurve für eine quantitative 16S-rRNA PCR mit komplementärer *Staphylococcus epidermidis* DNA-Matrize

In **Abbildung 23** sind die Ergebnisse der qPCR, sprich die Cp-Werte, für zwei *Staphylococcus epidermidis* cDNA-Verdünnungsreihen (unverdünnte cDNA-Konzentration: 184,80 ng/μl und 169,87 ng/μl) gegen die entsprechende Genomkopienzahl aufgetragen. Es werden alle Messpunkte dargestellt, jedoch diejenigen Punkte hervorgehoben, welche im linearen Messbereich liegen und daher in die Berechnung der Regressionsgeraden einfließen. Zusätzlich ist die Formel der Regressionsgeraden in der Abbildung angegeben, mit welcher in weiteren Messungen von einem Cp-Wert auf eine bestimmte RNA-Kopienzahl geschlossen werden konnte.



**Abbildung 23** Standardkurve für die Relation Cp-Wert einer spezifischen 16S-rRNA gegen die Kopienzahl der als Matrize dienenden komplementären *Staphylococcus epidermidis* DNA (cDNA). Dargestellt sind die Cp-Werte aus der qPCR gegen den dekadischen Logarithmus der errechneten Genomkopienzahl für *Staphylococcus epidermidis*. Der Bereich der linearen Korrelation lag zwischen Log(Kopienzahl)=3,61 und Log(Kopienzahl)=9,65 (fett gedruckt). Jeder Cp-Wert stellt den Mittelwert dreier technischer Replikate dar.

Gemäß dieser Standardkurve mussten cDNA-Proben verdünnt werden, damit diese in einer 16S-rRNA-PCR zu Cp-Werten im Bereich zwischen 10 und 30 führten.

### **4.4 Ergebnisse der 16S- RNA/DNA-Quantifizierung**

Die Ergebnisse der RNA/DNA-Quantifizierung wurden mittels der Formeln aus den zuvor erstellten Standardkurven in Kopienzahlen der jeweiligen Polynukleotid-Matrizen umgerechnet und anschließend miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Ausreißer innerhalb der technischen Replikate einer Messung wurden mittels des Dean Dixon Tests identifiziert und nicht mit in die Berechnung der RNA/DNA-Verhältnisse miteinbezogen. Aus übergreifend 144 einzelnen gemessenen Werten in der qPCR wurden insgesamt 4 Werte mit einem Signifikanzniveau von  $P = 0,05$  als Ausreißer identifiziert und aus der Analyse eliminiert. Es wurde nicht mehr als ein technisches Replikat je Messung als Ausreißer definiert.

Im Weiteren wurden zunächst die Umrechnungs-Ergebnisse aller zusammengehörender und nicht eliminierter technischen Replikate gemittelt. Dann wurden die daraus abgeleiteten Werte für alle zusammengehörenden biologischen Replikate gemittelt. Die Ergebnisse dieser doppelten Mittelungsschritte werden in Tabelle 29 sowohl für *Staphylococcus epidermidis* als auch für *Staphylococcus aureus* dargestellt.

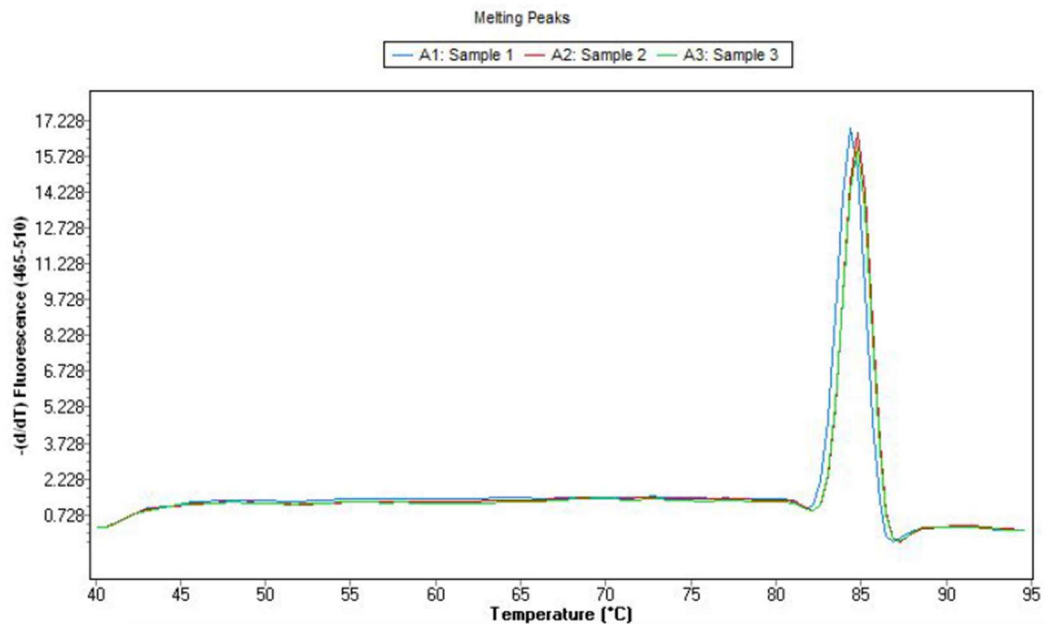
## Ergebnisse

Replikate der verschiedenen Matrizen genomischer DNA	RNA/DNA-Verhältnis
<i>S. aureus</i> VBNC 1	70,16
<i>S. aureus</i> VBNC 2	7383,45
<i>S. aureus</i> VBNC 3	129,93
<i>S. aureus</i> Planktonisch 1	57,69
<i>S. aureus</i> Planktonisch 2	772,76
<i>S. aureus</i> Planktonisch 3	146,45
<i>S. aureus</i> Biofilm 1	5,64
<i>S. aureus</i> Biofilm 2	295,41
<i>S. aureus</i> Biofilm 3	31,75
<i>S. aureus</i> Tot 1	20,82
<i>S. aureus</i> Tot 2	12,90
<i>S. aureus</i> Tot 3	15,98
<i>S. epidermidis</i> VBNC 1	7307,67
<i>S. epidermidis</i> VBNC 2	3123,34
<i>S. epidermidis</i> VBNC 3	7404,77
<i>S. epidermidis</i> Plankt. 1	3403,68
<i>S. epidermidis</i> Plankt. 2	8206,05
<i>S. epidermidis</i> Plankt. 3	14202,21
<i>S. epidermidis</i> Biofilm 1	27289,82
<i>S. epidermidis</i> Biofilm 2	8606,92
<i>S. epidermidis</i> Biofilm 3	8253,76
<i>S. epidermidis</i> Tot 1	3,84
<i>S. epidermidis</i> Tot 2	8,53
<i>S. epidermidis</i> Tot 3	2,10

Tabelle 29 Verhältnisse der 16S-RNA- zu 16S-DNA-Mengen aller biologischen Replikate von *Staphylococcus aureus*- und *Staphylococcus epidermidis*-Kulturen in allen zu untersuchenden Zuständen

Mittels der Schmelzkurvenanalyse wurde sichergestellt, dass ausschließlich gleich große Fragmente in der qPCR produziert wurden. Hier wird beispielhaft eine Schmelzkurvenanalyse dreier technischer Replikate aus den durchgeführten Messungen dargestellt (**Abbildung 24**).

## Ergebnisse



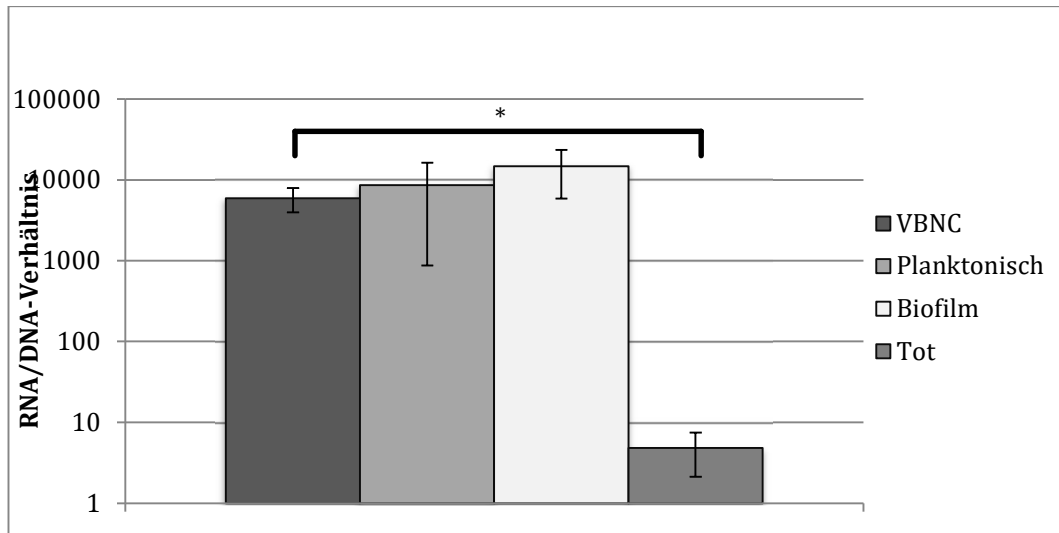
**Abbildung 24 Repräsentative Schmelzkurve von Produkten eines spezifischen qPCR-Ansatzes.** Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität durch das Freiwerden von Farbstoffmolekülen abhängig von der Temperatur. Der einheitliche Gipfel verdeutlicht, dass in allen technischen Replikaten dieser Messung ein Fragment mit demselben Schmelzpunkt und somit der gleichen Größe synthetisiert wurden.

Die RNA/DNA-Verhältnisse aus Zellen nach VBNC-Induktion wurden gegen die RNA/DNA-Verhältnisse der drei anderen metabolischen bzw. physiologischen Zustände mittels des T-Test geprüft.

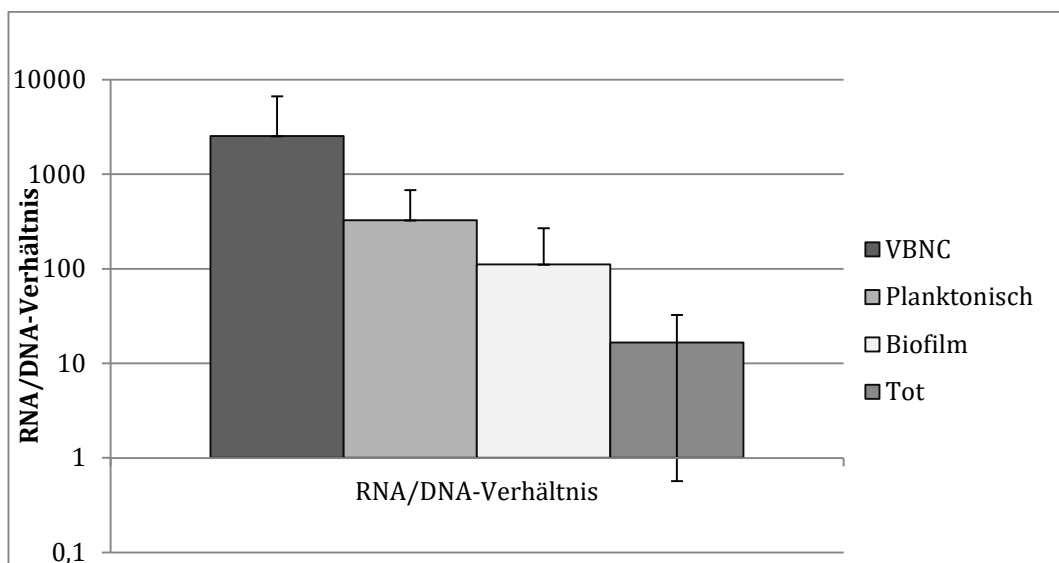
Im Folgenden werden die gemittelten RNA/DNA-Verhältnisse für alle Zustände jeweils für *Staphylococcus epidermidis* (**Abbildung 25**) und *Staphylococcus aureus* (**Abbildung 26**) dargestellt. Für *Staphylococcus epidermidis* wurde ein signifikanter Unterschied der normierten 16S rRNA-Mengen in VBNC-Zellen zu der in thermisch abgetöteten Zellen festgestellt ( $P=0,05$ ). Im Vergleich der normierten RNA-Mengen aus den übrigen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Dabei setzt sich die gemessene rRNA-Menge aus der kurz vor der Messung transkribierten rRNA und der z.B. in Ribosomen komplexiert persistierenden rRNA zusammen. Diese Summe wird im weiteren als rRNA-Expression angesprochen.

## Ergebnisse



**Abbildung 25 Vergleich der 16S-rRNA/rDNA-Verhältnisse aller hier untersuchten physiologischen Zustände in *Staphylococcus epidermidis*.** Für alle per qPCR ermittelten 16S rRNA-Mengen wurde eine Normierung durch die Relation zur jeweilig vorhandenen 16S rDNA Menge und damit der jeweiligen Zellzahl im Ansatz erzielt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von allen zusammengehörigen Messreihen (technische und biologische Replikate). Zwischen thermisch abgetöteten Zellen und Zellen nach VBNC-Induktion bestand ein signifikanter Unterschied in der Expression von 16S-rRNA ( $P=0,05$ , mit \* gekennzeichnet). Zwischen VBNC-Zellen und Zellen nach planktonischem Wachstum oder Zellen aus Biofilmverbänden besteht kein signifikanter Unterschied für die entsprechenden Transkriptionsraten.



**Abbildung 26 Vergleich der 16S-rRNA/rDNA-Verhältnisse aller hier untersuchten physiologischen Zustände in *Staphylococcus aureus*.** Für alle per qPCR ermittelten 16S rRNA-Mengen wurde eine Normierung durch die Relation zur jeweilig vorhandenen 16S rDNA Menge und damit der jeweiligen Zellzahl im Ansatz erzielt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte von allen zusammengehörigen Messreihen (technische und biologische Replikate). Zwischen allen untersuchten Zuständen bestand kein signifikanter Unterschied für die entsprechenden Transkriptionsraten.



## 5 Diskussion

### 5.1 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode gefunden werden, um *Staphylococcus aureus*- oder *Staphylococcus epidermidis*-Kulturen zuverlässig und möglichst effizient in einen Zustand der vermehrungslosen aber lebensfähigen Existenz (den Viable but non-culturable-Zustand) überführen zu können. Der Nachweis des Daseins im VBNC-Zustand sollte zunächst durch den Vergleich von mittels Durchflusszytometrie und Kulturtechniken nachgewiesenen Zahlen aller vs. vermehrungsfähiger Bakterien erfolgen. Zur Absicherung sollten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Nachweis intakter bzw. zerstörter Zellmembranen durchgeführt werden. Schließlich sollten VBNC-Zellkulturen mittels an der Gesamtzellzahl normierten quantitativen 16S-rRNA Messungen mit planktonisch bzw. im Biofilm gewachsenen oder thermisch abgetöteten verglichen werden, um so ggf. für einen physiologischen Zustand signifikante Profile erkennen zu können

Diese Untersuchungen sind zumindest für die beiden untersuchten Spezies weitestgehend neuartig, weswegen sich die einschlägige Literatur zur Untersuchung des VBNC-Zustandes in der überwiegenden Mehrzahl auf andere Spezies bezieht.

### 5.2 Der VBNC-Zustand: Definition, Induktion und Identifikation

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Induktion des VBNC-Zustandes für *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* zu entwickeln. Zwar konnte in vorherigen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass VBNC-Zellen stochastisch in Staphylokokken-Populationen unabhängig von Stressoren in der Umgebung vorkommen [32, 40], jedoch gingen die dort genutzten Protokolle zur gezielten Induktion des VBNC-Zustandes mit der Abtötung großer Teile der Gesamtpopulation einher. So zeigte sich, dass die Induktion des VBNC-Zustandes in *Staphylococcus aureus* durch die Verwendung von Antibiotika wie etwa Daptomycin und Entzug von Nährstoffen gelingen kann. Dies führte jedoch zu einem Zellanteil mit unbeeinträchtigter Zellmembranintegrität von unter 0,1 %. [54, 55]. Auch in anderen Bakterienspezies führte diese Art der Induktion des VBNC-Zustandes zwar zu einer Reduktion der Kultivierbarkeit, jedoch ebenso zu einem

## Diskussion

nur geringen Anteil an lebenden Zellen an den noch optisch nachweisbaren Gesamtkorpuskelzahlen [43, 46, 103].

Daher lag das Augenmerk dieser Arbeit primär auf der Entwicklung einer Induktionsmethode, die nur geringe Anteile der initial vorhandenen Zellpopulation tötete und den Großteil dieser Population in einen nichtkultivierbaren Zustand bei erhaltener Lebensfähigkeit versetzte.

Durch die Inkubation von frisch in die stationäre Wachstumsphase eingetretenen Zellen in einem Milieu mit mildem pH-Stress und Nährstoffentzug konnte ein hoher Anteil (mindestens 82 %) der Zellpopulation in einen nicht kultivierbaren Zustand bei intakter Zellmembran gebracht werden. Zusätzlich ist es gelungen den Anteil toter Zellen auf einen in Prozenten zu bemessenden Bruchteil der Zellpopulation zu beschränken. Während bisherige In-vitro-Methoden zur VBNC-Induktion bakterieller Zellen logarithmische Anteile der initialen Population abtöteten, konnte hier ein Anteil toter Zellen von unter 20 % erreicht werden.

Daher wurde das in dieser Arbeit formulierte erste Ziel für die effiziente und reproduzierbare Induktion eines VBNC-Zustandes erfüllt. Trotzdem stellt die Definition der Lebensfähigkeit einer bakteriellen Zelle eine zentrale Problematik in der Untersuchung des VBNC-Zustandes dar. Die Lebensfähigkeit wird häufig durch eine intakte Zellmembran bzw. einen aktiven Metabolismus oder eine aktive Genexpression definiert [30, 37, 104]. Um also exakt einschätzen zu können, in welchem Zustand sich die hier untersuchten Staphylokokken-Stämme befinden, sollten möglichst viele dieser Eigenschaften geprüft werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Lebend-Tot („Live-Dead“) -Färbung mittels SYTO9 und Propidiumiodid zur Messung der Membranintegrität ist eine weit verbreitete Methode zur Messung der Lebensfähigkeit [37, 83, 94]. Da jedoch nur die Membranintegrität untersucht wird, ist eine fälschliche Einordnung beispielsweise von Zellen, deren Zellmembranintegrität zwar noch existiert, die jedoch keinen aktiven Metabolismus mit Genexpression mehr aufweisen bzw. vice versa, möglich [37, 75, 105].

In der Durchflusszytometrie konnten Zellen differenziert werden, welche eine Färbung sowohl durch SYTO9 als auch Propidiumiodid erfahren haben. Solche Zellen werden regelmäßig in Bakterienpopulationen beobachtet, die potentiell tödlichem Stress ausgesetzt waren. Sie werden häufig als nichttödlich verletzt oder einfach als verletzt bezeichnet [89, 106]. Problematisch ist hierbei, dass einerseits verletzte Zellen ein

## Diskussion

Kriterium für tote Zellen erfüllen, jedoch andererseits solche in der Durchflusszytometrie als verletzt erkannten Zellen nach Ausplattierung auf Festmedien in Wiederbelebungsversuchen anteilig die Fähigkeit zur Koloniebildung zeigten oder einen weiterhin messbaren Metabolismus aufwiesen [105, 107, 108]. Dies legt nahe, dass neben der Fähigkeit zur Zellteilung und Wachstum auch eine erhaltene Membranintegrität keine notwendige Eigenschaft lebender Zellen darstellt und somit keine absolute Aussagekraft über die Lebensfähigkeit einer Zelle hat.

Für den Zweck dieser Arbeit wurden doppelt angefärbte Zellen aufgrund dieser Erkenntnisse in der Betrachtung der Fluoreszenz als lebende Zellen gewertet. Eine genauere Betrachtung dieser Subpopulationen hinsichtlich ihrer Genexpression im Vergleich zu nicht kultivierbaren aber lebensfähigen Zellen mit gänzlich erhaltener Membranintegrität verspricht ein besseres Verständnis über die bestimmenden Faktoren der Überlebensfähigkeit einer bakteriellen Zelle.

Bei der Verwendung von SYTO9 ist zu berücksichtigen, dass es zum Ausbleichen des Farbstoffes kommen kann, was wiederum zu einer fehlerhaften Einordnung von Zellen als tot führen kann. Hintergrundfluoreszenz ungebundener Farbstoffmoleküle oder Emission von SYTO9-Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des Propidiumiodids kann ebenfalls die Zuordnung von Zellen in bestimmte Zustände verfälschen. Für SYTO9 wurde bei der Untersuchung gramnegativer Bakterienspezies eine höhere Bindungsaffinität zu toten Zellen beobachtet. Für grampositive Spezies muss bis zum Beweis des Gegenteils dieses Phänomen als möglich erachtet werden [109].

Bei der Verwendung der Durchflusszytometrie ist nicht auszuschließen, dass bei der Festsetzung der „Gates“ Teile der Zellpopulation speziell nach VBNC-Induktion nicht innerhalb dieser Grenzen lagen. Während des Übertritts einer Zelle in den VBNC-Zustand konnte in vielen Fällen eine Form und Größenänderung der Zelle beobachtet werden [30, 31]. So besteht die Möglichkeit, dass die „Gates“, welche für planktonisch gewachsene Zellen so gesetzt wurden, dass nur wenige tote oder nicht wachstumsfähige Zellen erfasst wurden, VBNC-Zellen mit veränderter Größe und Form ausschlossen.

Eine Untersuchung spezifischer Zellpopulationen nach deren apparativer Sortierung anhand von Fluoreszenzintensitäten könnte helfen, die molekularen Unterschiede zwischen den Subpopulationen klarer darzustellen. Leider stand im Rahmen der Arbeit kein entsprechend komplexer FACS-Sorter zur Verfügung.

## Diskussion

Die klare Abgrenzung von toten zu lebenden Zellen lässt sich also nicht durch die Untersuchung eines einzelnen Merkmales erreichen. Es erscheint sinnvoll, mehrere Methoden zur Bestimmung der Lebensfähigkeit einer Zelle zu kombinieren wie etwa Vitalfärbungen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität, PCR-Methoden zur Bestimmung der Genexpression und „Live/Dead“-Färbungen zur Bestimmung der Membranintegrität.

Nebenbefundlich zeigte sich bei der Durchflusszytometrie von VBNC-Zellen eine scheinbare Abhängigkeit der Membranintegrität der Zellen von der Zelldichte im Induktionsmedium. So wurde nach Inkubation im Induktionsmedium bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,0 ein Anteil Zellen mit aufgehobener Membranintegrität von 36,58 % gemessen, während dieser bei einer optischen Dichte von 0,5 und 0,1 bei 11,42 % und 0,91 % lag. Ebenso zeigte sich ein erhöhter Anteil nicht kultivierbarer Zellen mit intakter Zellmembran bei einer geringeren optischen Dichte. Da das Induktionsmedium eine reine Elektrolytlösung mit einem pH von 6 war, kann dieser Effekt nicht an einem schnelleren Nährstoffverbrauch durch eine größere Menge Zellen liegen. Vielmehr scheint die Fähigkeit der Zellen dem Stress der Umgebung widerstehen zu können, von ihrer Zelldichte abzuhängen. Dies könnte durch einen Mechanismus ähnlich der Quorum Sensing (= Wahrnehmung der eigenen Populationsdichte) Regulation bedingt sein.

In aktuellen Publikationen wurde gezeigt, dass es in Mutanten von *Vibrio vulnificus* und *Vibrio parahaemolyticus*, deren Fähigkeit zum Quorum Sensing behindert war, zu einer langsameren Wiederbelebungsphase aus dem VBNC-Zustand kam [110]. Diese Ergebnisse wurden bisher allerdings noch nicht hinreichend häufig für andere Spezies repliziert und haben daher nur eine begrenzte Aussagekraft.

### 5.3 Normierte RNA Quantifizierung

Das zweite Ziel dieser Arbeit umfasste die Untersuchung der Expression von 16S-rRNA in Staphylokokken in den verschiedenen vorbeschriebenen Zuständen. Ein signifikanter Unterschied in der Expression von ribosomaler RNA könnte eine Möglichkeit zur Unterscheidung von Zellen darstellen, die unter guten Umgebungsbedingungen wuchsen (mögliche Kontaminanten aus der Hautflora) und Zellen, die die Fähigkeit zur Zellteilung zumindest zeitweilig verloren haben (z.B. Erreger auf orthopädischen Implantaten).

## Diskussion

Durch die vergleichende Quantifizierung von DNA und RNA desselben Genortes sollte bestimmt werden, ob das in vielen Studien zur bakteriellen Genexpression als Referenzgen verwendete 16S-rDNA-Gen für Untersuchungen des VBNC-Zustandes - zumal für die hier verwendeten Spezies - geeignet ist. Eine signifikante Änderung in der Expression des 16S-rDNA-Gens in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand und der Zelldichte würde bedeuten, dass einerseits Ergebnisse auf Basis von Untersuchungen mit diesem Gen als Referenz für andere Spezies reevaluiert werden müssten. Andererseits müssten dann auch andere potenzielle Referenzgene auf ihre konstante Expression und somit ihre Eignung zur Untersuchung des VBNC-Zustandes hin untersucht werden.

Die Betrachtung der 16S rRNA/rDNA-Verhältnisse erbrachte für drei der vier untersuchten physiologischen Zustände keinen signifikanten Unterschied der Expression von 16S-rRNA in *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Lediglich bei Betrachtung von *Staphylococcus aureus* nach thermischer Abtötung im Vergleich zu Zellen desselben Stammes nach VBNC-Induktion konnte eine signifikante Reduktion der Expression von 16S-rRNA bzw. der Persistenz bereits transkribierter rRNA verzeichnet werden.

Dies stützt den bisherigen Ansatz, das 16S-rDNA-Gen als Referenzgen bei der Untersuchung der relativen Genexpression anderer Gene zu verwenden. Für die molekularbiologische Unterscheidung von VBNC-Zellen von kultivierbaren Zellen ist die Expressionsstärke von 16S-rRNA den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge jedoch nicht geeignet.

In Versuchen mit *Vibrio cholerae*-Kulturen wurde gezeigt, dass Zellpopulationen nach VBNC-Induktion bei niedrigen Temperaturen 16S-rRNA vermindert exprimieren [101]. In diesen Untersuchungen wurden jedoch Gemische mit unklaren Anteilen von VBNC-Zellen und toten Zellen geprüft. Somit besteht die Möglichkeit, dass die gefundene Reduktion der 16S-rRNA lediglich auf den Anteil toter Zellen (d.h. in diesem Fall ohne jegliche Genexpression) zurückzuführen war, da diese Zellen zur Menge vorhandener 16S-rDNA beitragen ohne die Menge an 16S-rRNA zu verändern. Somit hätte rein rechnerisch eine geringere Expression des 16S-rDNA-Gens beobachtet werden können.

Für die molekularbiologische Unterscheidung von VBNC-Zellen und Zellen in kultivierbarem Zustand erscheint die Untersuchung anderer Gene damit zielführender. So könnte sich die Expression von Genen für Chaperone oder Koenzyme des Translationsprozesses, wie etwa das *relA*-Gens [101] oder Elongationsfaktoren wie *tuf*

## Diskussion

eher als Referenzwert eignen. Auch Stress-response Gene wie *rpoS* oder Gene für Katalasen sind wichtig für die Erhaltung des VBNC-Zustandes und die Wiederbelebbbarkeit nach Erreichen geeigneter Umgebungsbedingungen [47, 110–114].

Zusätzlich zur Frage nach der Untersuchung der am besten geeigneten Referenzgene besteht das Problem die richtige Methode zur Beschreibung des Stoffwechselzustandes einzelner Zellen anzuwenden.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode erlaubt die Quantifizierung sowohl der Kopien eines Gens in der DNA einer Zelle als auch die Quantifizierung aller RNA-Kopien dieses Gens zum Zeitpunkt der Untersuchung. Wie sich an den Standardabweichungen der Ergebnisse dieser Untersuchung feststellen lässt, ist diese Methodik mit einer hohen Fehleranfälligkeit belastet. Bei der Erstellung der Standardkurven für die Interpretation der gemessenen Daten aus der qPCR potenzieren sich aufgrund der mehrfachen (reversen) Transkriptionsschritte kleinere Ungenauigkeiten. Hinzu kommt die Tatsache, dass die erstellten Standardkurven aufgrund technischer Einschränkungen nur einen begrenzten Bereich linearer Korrelation aufweisen. Da einige der erhobenen Daten an den Rändern dieses Bereiches lagen, waren sie nur eingeschränkt beurteilbar. Dieses Problem ist zukünftig mit der technisch nunmehr möglichen RNA-Quantifizierung mittels direkter Sequenzierung angebar [115, 116].

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die kulturelle Vermehrung stellt eine der weitest verbreiteten und günstigsten Methoden zum Nachweis von mikrobiologischen Lebensformen dar. Problematisch wird diese Art der Diagnostik, wenn bakterielle Zellen einen Zustand einnehmen, in welchem sie diese Eigenschaft von in jeder Hinsicht vollkommen kompetenten Zellen nicht mehr aufweisen, jedoch weiterhin andere auf Leben hindeutende Eigenschaften, wie eine aktive Genexpression oder einen intakten Zellkörper, besitzen. Dieser Zustand wird als „viable but non culturable“ (VBNC) bezeichnet.

In solchen Fällen kann für den Nachweis auf molekularbiologische Methoden zurückgegriffen werden, mit denen das Vorhandensein von Gensequenzen bestimmter Spezies nachgewiesen werden kann. Die PCR ist eine hochempfindliche Methode, welche zum Nachweis auch kleiner Mengen an DNA verwendet werden kann. Sollte im Zuge klinischer Diagnostik bei fehlender oder nur sehr aufwändig zu erzielender Kultivierbarkeit eines vermuteten Erregers (etwa bei Lockerung einer Hüftprothese) mittels PCR ein Keim nachgewiesen werden, stellt sich die Frage, ob dieser Keim legitim als zum Untersuchungszeitpunkt präsenter Verursacher einer Erkrankung angesehen werden kann oder ob es sich um eine noch persistierende DNA des bereits abgestorbenen Keims oder auch um eine arbeitsprozessbedingte Kontamination handelt. Diese Aussage ist für Anwendung einer Antibiotikatherapie überhaupt und für deren Spezifikation von entscheidender Bedeutung. Eine fälschliche Anwendung hilft dem betroffenen Patienten nicht, belastet ihn aber unnötig und birgt zudem die Gefahr der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen.

In dieser Arbeit wurde eine Methode gefunden mittels derer *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* innerhalb von 24 Stunden in den VBNC-Zustand überführt werden können. Der Vorteil gegenüber zuvor beschriebenen Methoden zur Induktion des VBNC-Zustandes, etwa in *Staphylococcus aureus*, besteht darin, dass der Großteil der Zellen sich nach Induktion im VBNC-Zustand befindet und nur ein Bruchteil der Population zusätzlich zu der Fähigkeit zur Replikation die Zellmembranintegrität verliert. Dies erlaubt eine deutlich bessere Beurteilung des VBNC-Zustandes im Vergleich zur davor geltenden Situation von Zellkulturen mit nur geringen Anteilen an VBNC-Zellen. Eine exakte Beurteilung der molekularbiologischen Vorgänge in einer bakteriellen Zelle im VBNC-Zustand kann jedoch nur dann gelingen, wenn sich entweder die gesamte untersuchte Zellpopulation im gleichen metabolischen Zustand befindet oder eine Methode angewandt

## Zusammenfassung und Ausblick

wird, mit welcher einzelne Zellen separat auf ihre metabolischen Eigenschaften hin untersucht werden können.

Es besteht eine Reihe von Zelleigenschaften, welche nach breiter wissenschaftlicher Meinung Lebensfähigkeit suggerieren. So kann die Lebensfähigkeit anhand einer intakten Zellmembran, einer aktiven Genexpression oder anhand des enzymatischen Umsatzes von Metaboliten festgestellt werden. Eine Einordnung einer bakteriellen Zelle in den VBNC-Zustand lediglich anhand fehlender Kultivierbarkeit und eines einzelnen lebensfähigkeitsbestimmenden Faktors (Zellmembranintegrität) kann daher nur näherungsweise erfolgen. Eine Kombination mehrerer Methoden zur Bestimmung der Lebensfähigkeit einer Zelle ist vorzuziehen, um eine treffende Aussage über den Zustand einer Zelle machen zu können.

Um feststellen zu können, ob die Expression von 16S-rRNA signifikant durch den Übergang in einen nicht kultivierbaren Zustand bei intakter Zellmembran beeinflusst wird, wurde aus in zuvor in den VBNC-Zustand versetzten wie auch einfach planktonisch bzw. im Biofilm gewachsenen sowie thermisch abgetöteten Staphylokokken eine Quantifizierung der 16S-rDNA und der 16S-rRNA mittels qPCR durchgeführt. Es konnte keine signifikante Änderung des Verhältnisses von 16S-rRNA zu 16S-rDNA zwischen VBNC-Zellen, Zellen aus Biofilmverbänden und Zellen nach planktonischem Wachstum gefunden werden. In der statistischen Auswertung wurden große Standardabweichungen der erhobenen RNA/DNA-Verhältnisse festgestellt. Eine Änderung der Methodik zu weniger fehleranfälligen Verfahren ist daher empfehlenswert.

Anhand des Ergebnisses kann die Verwendung des 16S-rDNA-Gens als Marker zur molekularbiologischen Unterscheidung von VBNC-Zellen und Zellen in kultivierbaren Zuständen nicht empfohlen werden – ungeachtet dessen, dass das 16S-rDNA-Gen als Referenzgen für Genexpressionsmessungen gut einsetzbar ist. Die Untersuchung weiterer Gene, etwa von Stress-response Genen wie *rpoS*, *relA* oder *tuf* könnten zur klareren Unterscheidbarkeit der metabolischen Zustände einzelner Zellen führen.



## VI. Thesen

1. *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind grampositive humanpathogene Bakterien, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung häufig mit Implantat- und Katheter-assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht werden.
2. Das Wachstum als Biofilm ist eine phylogenetisch alte Form Vegetationsform, welche es Bakterienpopulationen erlaubt eine hohe Widerstandskraft gegenüber widrigen physikalischen Umwelteinflüssen und antimikrobiellen Substanzen zu erlangen.
3. Die Lebensfähigkeit (Viabilität) einer Zelle wird durch eine Vielzahl an Merkmalen bestimmt. Die gängigste Art zum Nachweis viabler bakterieller Zellen stellt die Ermittlung der Lebendkeimzahl auf Nährmedien dar. Diese Methode kann jedoch nicht jene bakteriellen Zellen nachweisen, denen die Fähigkeit zum Wachstum auf Nährmedien fehlt, die aber einen aktiven Metabolismus und Genexpression aufweisen.
4. Der VBNC-Zustand stellt eine Vegetationsform dar, in der Bakterien einen nachweisbaren Metabolismus aufweisen, jedoch nicht auf Festmedien kultivierbar sind. Dieser Zustand tritt in allen größeren Bakterienpopulationen auf, wird jedoch unter Nährstoffentzug oder widrigen Umweltbedingungen wie pH-Verschiebungen oder die Anwesenheit antimikrobieller Substanzen vermehrt induziert. Es gibt Hinweise, dass die Formierung von VBNC-Populationen u.a. abhängig von der Zelldichte einer Population ist.
5. Der VBNC-Zustand kann in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Staphylococcus epidermidis* 1457 durch das Inkubieren in nährstoffarmer Kochsalzlösung mit einem pH von 6 induziert werden, ohne dass hierbei signifikante Anteile der Gesamtpopulation getötet werden. Dies lässt sich durch den Vergleich der in der Durchflusszytometrie gemessenen Anzahl lebender Zellen (definiert als Zellen mit intakter Zellmembran) in einer Gesamtpopulation mit der Lebendkeimzahl derselben Population (definiert als die Zahl der Koloniebildenden Einheiten auf Festmedium) nachweisen.
6. Der VBNC-Zustand stellt eine Herausforderung bei der Ermittlung ursächlicher Keime Implantat-assoziiierter Infektionen dar. Um Erreger unabhängig von ihrer Wachstumsfähigkeit nachzuweisen, wird in PCR-Reaktionen die DNA dieser

## Thesen

Erreger nachgewiesen. Die Unterscheidung, ob per PCR nachgewiesene Erreger sich in dem VBNC-Zustand befinden oder planktonisch wachsende Zellen darstellen kann dabei behilflich sein die Relevanz eines nachgewiesenen Erregers für die Infektion eines Patienten zu eruieren.

7. Das 16S-rRNA-Gen eignet sich aufgrund seiner stabilen Expressionsrate als Referenzgen bei der Genexpressionsanalyse von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Staphylococcus epidermidis* 1457 im VBNC-Zustand.
8. Die Expressionsrate des 16S-rRNA-Gens eignet sich nicht als Diskriminationsfaktor zwischen planktonischen, Biofilm- und VBNC-Zellen.

## VII. Literaturverzeichnis

- 1 *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus* (digital gefärbt), ID#18125. In: Public Health Image Library; 2006
- 2 *Seller FT*. Impetigo contagiosa auf der Stirn eines Patienten, ID#14922. In: Public Health Image Library; 1963
- 3 *Foster TJ, Höök M*. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998; 6: 484–488
- 4 *Loeb L*. The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood. *J Med Res* 1903; 10: 407–419
- 5 *Otto M*. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*; 2009; 7: 555-567
- 6 *Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O*. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 529-543
- 7 *Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, Braughton KR, Scott DP, Gardner DJ, Missiakas DM, Schneewind O, DeLeo FR*. Contribution of *Staphylococcus aureus* Coagulases and Clumping Factor A to Abscess Formation in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. *PLoS ONE* 2016; 11: e0158293
- 8 *Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Karaolis DK, Koren S, Ondov B, Phillippy AM, Bergman NH, Rosovitz MJ*. Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc* 2014; 2: e01110-14
- 9 *Vuong C, Otto M*. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002; 4: 481–489
- 10 *Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F et al*. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med* 2009; 41: 109-119
- 11 *Cheung GYC, Otto M*. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 208-216
- 12 *Galac MR, Stam J, Maybank R, Hinkle M, Mack D, Rohde H, Roth A, Fey PD*. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus epidermidis* 1457. *Genome Announc* 2017; 5: e00450-17
- 13 *Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P*. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108

## Literaturverzeichnis

- 14 *Donlan RM, Carr J.* Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus* mit Extrazellulärmatrix, ID#7486. In: Public Health Image Library; 2006
- 15 *Mah TF, O'Toole GA.* Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34–39
- 16 *Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.* Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 34-40
- 17 *Beer D de, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z.* Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43: 1131-1138
- 18 *Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE.* Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; 173: 6558–6567
- 19 *Cortés ME, Bonilla JC, Sinisterra RD.* Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 2011; 2: 896-905
- 20 *Magajna B, Schraft H.* Evaluation of Propidium Monoazide and Quantitative PCR To Quantify Viable *Campylobacter jejuni* Biofilm and Planktonic Cells in Log Phase and in a Viable but Nonculturable State. *J Food Prot* 2015; 78: 1303-1311
- 21 *Frösler J, Panitz C, Wingender J, Flemming H-C, Rettberg P.* Survival of *Deinococcus geothermalis* in Biofilms under Desiccation and Simulated Space and Martian Conditions. *Astrobiology* 2017; 17: 431-447
- 22 *Zhang J, Li W, Chen J, Qi W, Wang F, Zhou Y.* Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems. *Chemosphere* 2018; 203: 368-380
- 23 *Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE.* Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645-1654
- 24 *Sia IG, Berbari EF, Karchmer AW.* Prosthetic joint infections. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19: 885-914
- 25 *Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R.* Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007; 357: 654-663
- 26 *Zajonz D, Wuthe L, Rodloff AC, Prietzel T, Salis-Soglio G Freiherr von, Roth A, Heyde C-E, Josten C, Ghanem M.* Infektionen von Hüft- und Knieendoprothesen. Erregerspektrum und die Rolle multiresistenter Bakterien. *Chirurg* 2016; 87: 332-339
- 27 *Borens O, Helmy N.* Infizierte Osteosynthese. *Chirurg* 2016; 87: 822-830

## Literaturverzeichnis

- 28 *Del Pozo JL, Patel R.* Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* 2009; 361: 787-794
- 29 *Del Pozo JL, Patel R.* The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 204-209
- 30 *Oliver JD.* The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005; 43: 93–100
- 31 *Oliver JD.* Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2010; 34: 415-425
- 32 *Ayrapetyan M, Williams TC, Baxter R, Oliver JD.* Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infect Immun* 2015; 83: 4194-4203
- 33 *Orruño M, Kaberdin VR, Arana I.* Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol* 2017; 33: 45
- 34 *Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S.* Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health* 2014; 2: 103
- 35 *Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2014; 5: 258
- 36 *Fida TT, Moreno-Forero SK, Heipieper HJ, Springael D.* Physiology and transcriptome of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. LH128 after long-term starvation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 2013; 159: 1807-1817
- 37 *Schrammel B, Cervero-Aragó S, Dietersdorfer E, Walochnik J, Lück C, Sommer R, Kirschner A.* Differential development of *Legionella* sub-populations during short- and long-term starvation. *Water Res* 2018; 141: 417-427
- 38 *Wu B, Liang W, Kan B.* Growth Phase, Oxygen, Temperature, and Starvation Affect the Development of Viable but Non-culturable State of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol* 2016; 7: 404
- 39 *Bruhn-Olszewska B, Szczepaniak P, Matuszewska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Stojowska-Swędryńska K, Murono Algara M, Laskowska E.* Physiologically distinct subpopulations formed in *Escherichia coli* cultures in response to heat shock. *Microbiol Res* 2018; 209: 33-42
- 40 *Cerca F, Andrade F, França Â, Andrade EB, Ribeiro A, Almeida AA, Cerca N, Pier G, Azeredo J, Vilanova M.* *Staphylococcus epidermidis* biofilms with higher proportions of

## Literaturverzeichnis

- dormant bacteria induce a lower activation of murine macrophages. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1717-1724
- 41 Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000317
- 42 Epalle T, Girardot F, Allegra S, Maurice-Blanc C, Geraud O, Riffard S. Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Ecol* 2015; 69: 215-224
- 43 Fernández-Delgado M, García-Amado MA, Contreras M, Incani RN, Chirinos H, Rojas H, Suárez P. Survival, induction and resuscitation of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state in the Southern Caribbean Sea. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57: 21-26
- 44 Jing M, Wang L. Analysis of Pathogenic Bacteria in Reclaimed Water and Impact of UV Disinfection on the Removal of Pathogenic Bacteria. *Huan Jing Ke Xue* 2016; 37: 622–629
- 45 Kong HG, Bae JY, Lee HJ, Joo HJ, Jung EJ, Chung E, Lee S-W. Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. *PLoS ONE* 2014;9: e109792
- 46 Liao H, Jiang L, Zhang R. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella* Typhimurium by thermosonication and factors affecting resuscitation. *FEMS Microbiol Lett* 2018; 365: fnx249
- 47 Lin H, Ye C, Chen S, Zhang S, Yu X. Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. *Environ Pollut* 2017; 230: 242-249
- 48 Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Punnapuzha A, Philip S, Mundkur L. Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial formulations using Flow cytometry. *PLoS ONE* 2018; 13: e0192836
- 49 Mali S, Mitchell M, Havis S, Bodunrin A, Rangel J, Olson G, Widger WR, Bark SJ. A Proteomic Signature of Dormancy in the Actinobacterium *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol* 2017; 199: e00206-17
- 50 Morishige Y, Fujimori K, Amano F. Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and its Analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ* 2013; 28: 180-186

## Literaturverzeichnis

- 51 *Morishige Y, Fujimori K, Amano F.* Use of Flow Cytometry for Quantitative Analysis of Metabolism of Viable but Non-culturable (VBNC) Salmonella. *Biol Pharm Bull* 2015; 38: 1255-1264
- 52 *Morishige Y, Koike A, Tamura-Ueyama A, Amano F.* Induction of Viable but Nonculturable Salmonella in Exponentially Grown Cells by Exposure to a Low-Humidity Environment and Their Resuscitation by Catalase. *J Food Prot* 2017; 80: 288-294
- 53 *Morishige Y, Tanda M, Fujimori K, Mino Y, Amano F.* Induction of viable but non-culturable (VBNC) state in Salmonella cultured in M9 minimal medium containing high glucose. *Biol Pharm Bull* 2014; 37: 1617–1625
- 54 *Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F.* Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in Staphylococcus aureus growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1812-1817
- 55 *Pasquaroli S, Citterio B, Di Cesare A, Amiri M, Manti A, Vuotto C, Biavasco F.* Role of daptomycin in the induction and persistence of the viable but non-culturable state of Staphylococcus aureus biofilms. *Pathogens* 2014; 3: 759-768
- 56 *Sakil Munna M, Tahera J, Mohibul Hassan Afrad M, Nur IT, Noor R.* Survival of Bacillus spp. SUBB01 at high temperatures and a preliminary assessment of its ability to protect heat-stressed Escherichia coli cells. *BMC Res Notes* 2015; 8: 637
- 57 *Gonçalves FDA, Carvalho CCCR de.* Phenotypic Modifications in Staphylococcus aureus Cells Exposed to High Concentrations of Vancomycin and Teicoplanin. *Front Microbiol* 2016; 7: 13
- 58 *Pawlowski DR, Metzger DJ, Raslawsky A, Howlett A, Siebert G, Karalus RJ, Garrett S, Whitehouse CA.* Entry of Yersinia pestis into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap water microcosm. *PLoS ONE* 2011; 6: e17585
- 59 *Orta de Velásquez MT, Yáñez Noguez I, Casasola Rodríguez B, Román R, Priscila I.* Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC Helicobacter pylori by molecular techniques and FESEM images. *Environ Technol* 2017; 38: 744-753
- 60 *Serpaggi V, Remize F, Recorbet G, Gaudot-Dumas E, Sequeira-Le Grand A, Alexandre H.* Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast Brettanomyces. *Food Microbiol* 2012; 30: 438-447

## Literaturverzeichnis

- 61 Su C-P, Jane W-N, Wong H-C. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state. *Int J Food Microbiol* 2013; 160: 360-366
- 62 E J, Jiang YT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Genet Mol Res* 2015; 14: 14790-14801
- 63 Loke MF, Ng CG, Vilashni Y, Lim J, Ho B. Understanding the dimorphic lifestyles of human gastric pathogen *Helicobacter pylori* using the SWATH-based proteomics approach. *Sci Rep* 2016; 6: 26784
- 64 Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin C-W, Ding T. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front Microbiol* 2017; 8: 580
- 65 Imamura D, Mizuno T, Miyoshi S-I, Shinoda S. Stepwise changes in viable but nonculturable *Vibrio cholerae* cells. *Microbiol Immunol* 2015; 59: 305-310
- 66 Johnson PE, Muttill P, MacKenzie D, Carnes EC, Pelowitz J, Mara NA, Mook WM, Jett SD, Dunphy DR, Timmins GS, Brinker CJ. Spray-Dried Multiscale Nano-biocomposites Containing Living Cells. *ACS Nano* 2015; 9: 6961-6977
- 67 Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J Bacteriol* 1991; 173: 5054–5059
- 68 Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Ramamurthy T, Colwell RR, Miyoshi S-I, Nair GB, Takeda Y. Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 342-345
- 69 Senoh M, Hamabata T, Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *Microbiologyopen* 2015; 4: 589-596
- 70 Whitesides MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 1002–1005
- 71 Fakruddin M, Mannan KSB, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiol* 2013; 2013: 703813
- 72 Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64: 357-372
- 73 Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol* 2015; 23: 7-13
- 74 Bamford RA, Smith A, Metz J, Glover G, Titball RW, Pagliara S. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol* 2017; 15: 121



## Literaturverzeichnis

- 75 Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; 305: 1622-1625
- 76 Kim J-S, Chowdhury N, Yamasaki R, Wood TK. Viable But Non-Culturable and Persistence Describe the Same Bacterial Stress State. *Environ Microbiol* 2018; 20: 2038-2048
- 77 Kortebe M, Milohanic E, Mitchell G, Péchoux C, Prevost M-C, Cossart P, Bierne H. *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006734
- 78 Su X, Guo L, Ding L, Qu K, Shen C. Induction of Viable but Nonculturable State in *Rhodococcus* and Transcriptome Analysis Using RNA-seq. *PLoS ONE* 2016; 11: e0147593
- 79 Meng L, Alter T, Aho T, Huehn S. Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol* 2015; 91: fiv035
- 80 Fida TT, Moreno-Forero SK, Breugelmans P, Heipieper HJ, Röling WFM, Springael D. Physiological and Transcriptome Response of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading *Novosphingobium* sp. LH128 after Inoculation in Soil. *Environ Sci Technol* 2017; 51: 1570-1579
- 81 Jia J, Li Z, Cao J, Jiang Y, Liang C, Liu M. Proteomic Analysis of Protein Expression in the Induction of the Viable But Nonculturable State of *Vibrio harveyi* SF1. *Current Microbiology* 2013; 67: 442-447
- 82 Coutard F, Crassous P, Droguet M, Gobin E, Colwell RR, Pommepuy M, Hervio-Heath D. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? *ISME J* 2007; 1: 111-120
- 83 Zandri G, Pasquaroli S, Vignaroli C, Talevi S, Manso E, Donelli G, Biavasco F. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E259-61
- 84 Liu J, Zhou R, Li L, Peters BM, Li B, Lin C-W, Chuang T-S, Chen D, Zhao X, Xiong Z, Xu Z, Shirliff ME. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Res Microbiol* 2017; 168: 188-193

## Literaturverzeichnis

- 85 Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. *J Appl Microbiol* 2012; 112: 945-953
- 86 Conconi A, Jager-Vottero P, Zhang X, Beard BC, Smerdon MJ. Mitotic viability and metabolic competence in UV-irradiated yeast cells. *Mutat Res* 2000; 459: 55-64
- 87 Chen S, Cao Y, Ferguson LR, Shu Q, Garg S. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 95: 345-356
- 88 Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018: pdb.prot095497
- 89 Léonard L, Bouarab Chibane L, Ouled Bouhedda B, Degraeve P, Oulahal N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Front Microbiol* 2016; 7: 1225
- 90 Chiron C, Tompkins TA, Burguière P. Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products. *J Appl Microbiol* 2018; 124: 572-584
- 91 Abd El-Aziz NK, Tartor YH, Gharib AAE-A, Ammar AM. Propidium Monoazide Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Enumeration of Some Viable but Nonculturable Foodborne Bacteria in Meat and Meat Products. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15: 226-234
- 92 Chen L, Zhu X, Zhang M, Wang Y, Lv T, Zhang S, Yu X. Profiling Total Viable Bacteria in a Hemodialysis Water Treatment System. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27: 995-1004
- 93 Kibbee RJ, Örmeci B. Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent. *J Microbiol Methods* 2017; 132: 139-147
- 94 van Frankenhuyzen JK, Trevors JT, Flemming CA, Lee H, Habash MB. Optimization, validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013; 40: 1251-1261
- 95 Barth VC, Cattani F, Ferreira CAS, Oliveira SD de. Sodium chloride affects propidium monoazide action to distinguish viable cells. *Anal Biochem* 2012; 428: 108-110

## Literaturverzeichnis

- 96 *Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE*. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999; 26: 112-122, 124-125
- 97 *Buyser ML de, Morvan A, Aubert S, Dilasser F, el Solh N*. Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 889-899
- 98 *Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y*. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 908-934
- 99 *Wang X, Jordan IK, Mayer LW*. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In: Sussman M, Tang Y-W, Hrsg. *Molecular Medical Microbiology: Three-volume-set*. 2 Aufl.: Academic Press; 2014: 517–536
- 100 *Kozera B, Rapacz M*. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 2013; 54: 391-406
- 101 *González-Escalona N, Fey A, Höfle MG, Espejo RT, A Guzmán C*. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ Microbiol* 2006; 8: 658-666
- 102 *Watson SP, Clements MO, Foster SJ*. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1998; 180: 1750–1758
- 103 *Liu J, Li L, Peters BM, Li B, Chen L, Deng Y, Xu Z, Shirliff ME*. The viable but nonculturable state induction and genomic analyses of *Lactobacillus casei* BM-LC14617, a beer-spoilage bacterium. *Microbiologyopen* 2017; 6: e00506
- 104 *Trevors JT*. Can dead bacterial cells be defined and are genes expressed after cell death? *J Microbiol Methods* 2012; 90: 25-28
- 105 *Yang Y, Xiang Y, Xu M*. From red to green: the propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella decolorationis* S12 is repairable. *Sci Rep* 2015; 5: 18583
- 106 *Davis C*. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods* 2014; 103: 9-17
- 107 *Amor KB, Breeuwer P, Verbaarschot P, Rambouts FM, Akkermans ADL, Vos WM de, Abee T*. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5209–5216

## Literaturverzeichnis

- 108 *Casini B, Baggiani A, Totaro M, Mansi A, Costa AL, Aquino F, Miccoli M, Valentini P, Bruschi F, Lopalco PL, Privitera G.* Detection of viable but non-culturable legionella in hospital water network following monochloramine disinfection. *J Hosp Infect* 2018; 98: 46-52
- 109 *Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q.* Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* 2015; 15: 36
- 110 *Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD.* Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 2478-2483
- 111 *Masmoudi S, Denis M, Maalej S.* Inactivation of the gene *katA* or *sodA* affects the transient entry into the viable but non-culturable response of *Staphylococcus aureus* in natural seawater at low temperature. *Mar Pollut Bull* 2010; 60: 2209-2214
- 112 *Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K.* General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 228-237
- 113 *Kusumoto A, Miyashita M, Kawamoto K.* Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella enterica* into a viable but non-culturable state. *Res Microbiol* 2013; 164: 335-341
- 114 *Li L, Mendis N, Trigui H, Faucher SP.* Transcriptomic changes of *Legionella pneumophila* in water. *BMC Genomics* 2015; 16: 637
- 115 *Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifemberger JG, Sass LE, McInerney P, Thompson JF, Bowers J, Jarosz M, Milos PM.* Direct RNA sequencing. *Nature* 2009; 461: 814-818
- 116 *Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, Sipos B, Lloyd JH, Bruce M, Pantic N, Admassu T, James P, Warland A, Jordan M, Ciccone J, Serra S, Keenan J, Martin S, McNeill L, Wallace EJ, Jayasinghe L, Wright C, Blasco J, Young S, Brocklebank D, Juul S, Clarke J, Heron AJ, Turner DJ.* Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods* 2018; 15: 201-206

## **VIII. Lebenslauf**

Name	Christoph Andreas Lehrich
Geburtsdatum	05. Juli 1990
Geburtsort	Speyer
1996-1998	Besuch der Grosse Ile Elementary School, Michigan, USA
1998-2000	Besuch der Grundschule Lemförde, Lemförde
2000-2002	Besuch der Orientierungsstufe Lemförde, Lemförde
2002-2005	Besuch des Feodor-Lynen-Gymnasiums, Planegg
2005-2009	Besuch der Graf-Friedrich-Schule, Diepholz
2009	Abitur, Graf-Friedrich-Schule, Diepholz
2009-2017	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Oktober 2012	Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation
Ab Juli 2017	Beschäftigung als Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Münster

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Rostock, den 10.05.2019

Christoph Andreas Lehrich